ANTIGENEXPRESSION AUF AKTIVIERTEN T-LYMPHOZYTEN

Stefan Endres

Diss
München
1984

Aus der Kinderpoliklinik der Universitaet Muenchen

Direktor: Prof. Dr. H. Spiess

ANTIGENEXPRESSION AUF AKTIVIERTEN T-LYMPHOZYTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwuerde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universitaet zu Muenchen

vorgelegt von

STEFAN ENDRES

aus Augsburg
1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Albert
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Spiess
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. März 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

ANTIGENEXPRESSION AUF AKTIVIERTEN T-LYMPHOZYTEN

GLIEDERUNG

		Seite
1	EINLEITUNG	1
1.1	Erklaerung des Themas	1
1.2	Das HLA-System	2
	.1 Definition	
	.2 Geschichte	
	.3 Genetik	
	.4 Gewebsverteilung	
	.5 Funktion	
1.3	Mitogene	5
1.4	Bisherige Erkenntnisse ueber Antigenexpression auf aktivierten T-Lymphozyten	6
1.5	Eigene Fragestellung	6
2.	MATERIALIEN UND METHODIK	7
2.1	Uebersicht	7
2.2	Auswahl der Seren	7
2.3	Absorption der Seren	7
2.4	Auswahl der Zellspender	8
2.5	Separation von Lymphozyten	8
2.6	Aktivierung von Lymphozyten in Kultur	10
2.7	Anreicherung von lebenden Lymphozyten	10
2.8	Anreicherung von B-Lymphozyten	11
2.9	Lymphozytotoxizitaetstest	12
2.10	Messung des Aktivierungsgrads von Lymphozyten	13
3.	ERGEBNISSE	15
3.1	Methodologische Ergebnisse - Etablierung eines Zellkultursystems	15
	.1 Parameter der Zellkultur	15
	.2 *-Thymidin-Inkorporation	15
	.3 Anteil lebender Zellen - Toxizitaet der Kulturbedingungen	18
	.4 Blastenentwicklung waehrend der Zellkultur	20
	.5 Zusammenfassung der Untersuchungen zu den Kulturbedingungen	22
	.6 Zusammenfassung der in der Literatur angegebenen Kulturbedingungen	23
	.7 Daten zum Kulturablauf der Zellkulturen	24
	.8 Anreicherung von lebenden Lymphozyten	31

3.2 Untersuchung von unausgewaehlten Schwangerenseren 32

.1 Vortestung der Seren 32
.2 Weitere Untersuchung der Seren mit B-Zell-Kontrolle 33
.3 Untersuchung mit absorbierten Seren 35

3.3 Untersuchung von Schwangerenseren mit DR-Antikoerpern 37

.1 Reaktionswerte der Seren 37
.2 Allgemeine Reaktivitaet der verschiedenen Zelltypen 40
.3 Vergleich der Reaktionen von PHA-2- und PHA-4-Blasten 41
.4 Vergleich der Reaktionen von PHA-O-Lymphozyten und B-Zellen 44
.5 DR-Expression auf stimulierten Lymphozyten 46
.6 Haeufigkeit blastenpositiver, B-Zell-negativer Reaktionen 47
.7 Beschreibung einzelner Seren 47
.8 Blastenspezifische Reaktionsgruppen innerhalb einer Familie 49

4. DISKUSSION 50

4.1 Kulturbedingungen 50
4.2 Reaktion von stimulierten T-Lymphozyten mit unausgewaehlten Schwangerenseren 51
4.3 Reaktion von stimulierten T-Lymphozyten bei Schwangerenseren mit DR-Antikoerpern 53

5. ZUSAMMENFASSUNG 57

6. LITERATURVERZEICHNIS 60

7. LEBENSLAUF 63

ABKUERZUNGEN

HLA = human leukozyte antigen
LZT = Lymphozytotoxizitaetstest
MHC = major histocompatibility complex
PHA = Phytohaemagglutinin
*T = Tritium-markiertes Thymidin

1. EINLEITUNG

1.1 Erklaerung des Themas

Thema der vorliegenden Arbeit ist die Antigenexpression auf aktivierten T-Lymphozyten beim Menschen.

Dazu wurden menschliche Lymphozyten in vitro mit einem Mitogen (pflanzlicher Stimulationsstoff) aktiviert. Mit serologischen Methoden (Reaktionen von Antikoerpern mit Antigenen auf der Zelloberflaeche), wurde dann nach unterschiedlichem Reaktionsverhalten von stimulierten und nicht-stimulierten Lymphozyten gesucht. Durch solche Reaktionsmuster lassen sich Rueckschluesse auf die Antigenexpression aktivierter Lymphozyten ziehen.
Antigenexpression wurde besonders im Bezug zum HLA-System betrachtet, der bestuntersuchten und
bisher komplexesten Gruppe von Antigenen auf der Oberflaeche menschlicher Zellen.

Zun besseren Verstaendnis des Themas sollen die folgenden Einzelpunkte naeher erlaeutert werden (in Klammern die jeweils herangezogenen Literaturquellen):

- Das HLA-System
  (Albert et al 1975, Albert et al 1979, Bender 1978)

- Mitogene
  (Waithe 1979, Janossy 1971)

- Bisherige Erkenntnisse ueber Antigenexpression
  auf stimulierten T-Lymphozyten
  (Gazit et al 1980a, Gazit et al 1980b, Kim et al 1980,
  Christiansen et al 1981, Gerbase de Lima et al 1981)

- Eigene Fragestellung

1.2 Das HLA-System

1.2.1 Definition

Das HLA-System ist ein System von Proteinen auf der Oberflaeche menschlicher Zellen. Wie am Beispiel der ABO-Blutgruppenmerkmale in einfacherer Form bekannt, bestehen auch im HLA-System in der Regel unterschiedliche Merkmale von Individuum zu Individuum. Diese Eigenschaft interindividueller Unterschiede innerhalb derselben Spezies wird Allospezifitaet genannt.

Die genetische Kodierung der HLA-Proteine liegt auf dem menschlichen Chromosom 6. Waehrend bei den ABO-Blutgruppenmerkmalen nur ein Genlocus mit wenigen Ausspraegungsmoeglichkeiten (Allelen) wie O, A1, A2 und B vorliegt, ist die genetische Organisation und die Anzahl moeglicher Allele beim HLA-Sysyem weitaus komplexer.
Gegenwaertig sind vier serologisch definierte Genloci bekannt, HLA-A,B,C und DR. Die zugehoerige Zahl bekannter Allele ist 20 fuer HLA-A, 40 fuer HLA-B, 8 fuer HLA-C und 12 fuer HLA-DR (Terasaki 1980).

Uebertraegt man Gewebe eines Individuums auf ein anderes Individuum derselben Spezies, so findet in der Regel eine Abstossungsreaktion statt. Dabei fungieren die Genprodukte des HLA-Systems als Transplantations-antigene, die je nach Grad ihrer Verschiedenheit zwischen Spender und Empfaenger eine immunologische Abwehrreaktion ausloesen. Aus diesem Grund werden die Membranproteine des HLA-Systems auch Gewebsvertraeglich-keits- oder Histokompatibilitaetsantigene bezeichnet.

Der Mensch ist nicht die einzige Spezies, bei der ein solches Histo-kompatibilitaetssystem bekannt ist. Bei allen untersuchten Saeugerspezies wurden entsprechende Membranantigene gefunden. Die sie kodierende genetische Region wird allgemein Haupthistokompatibilitaetskomplex (MHC fuer "major histocompatibility complex") genannt. Sie weist in ihrer Organisation und Struktur einen hohen Grad an Analogie zwischen den verschiedenen Spezies auf.

1.2.2 Geschichte

Am besten untersucht ist der MHC der Maus, dort H-2 Komplex genannt. Bei der Maus wurden auch erstmals allospezifische Antigene beschrieben (Gorer 1938). Gorer demonstrierte, dass die Abstossung eines Tumortransplantates direkt von Antigenen abhing, welche bei Verschiedenheit zwischen Transplantat-spender und -empfaenger zur Immunantwort des Spenders gegen Empfaenger-gewebe fuehren.

Erste Informationen ueber die genetische Organisation des MHC der Maus brachte die Untersuchen von ingezuechteten Mausstaemmen (Snell 1948). Zwischen des Nachkommen eines Maeusepaares wurde durch Hauttransplantation der jeweilige Abstossungsgrad untereinander bestimmt. Die zwei Maeuse welche von denselben Eltern abstammten und die maximale Abstossungsreaktion gegeneinander zeigten wurden miteinander gekreuzt. Wiederholung diese prozesses ueber mehrere Generationen fuehrte auf genetischer Ebene zu zwei Selektionsprozessen:

Durch Auswahl nach maximaler Abstossung wird jeweils das Maeusepaar weitergefuehrt, welches sich in einer genetischen Region unterscheidet, die fuer die Abstossung relevant ist. Gleichzeitig werden durch Auswahl und Weiterzuechtung innerhalb einer Geschwisterschar Unterschiede fuer solche Gene eliminiert, die nicht an der Abstossungsreaktion beteiligt sind.

Mit dieser Methode wurden Mausstaemme ingezuechtet, die sich nur in in einer genetischen Region unterschieden, von der man wusste, dass sie die Gewebsvertraeglichkeit steuert. Mehrere solcher genetischer Regionen wurden identifiziert und die wichtigste unter ihnen, die H-2 Region wurde Haupthistokompatibilitaetskomplex genannt.

In weiteren Arbeiten, wie die Untersuchung von Rekombinationen durch crossing-over innerhalb der H-2 Region, wurden genauere Kenntnisse ueber die Organisation der einzelnen Gene innerhalb des Maus-MHC gewonnen. Spaeter wurden diese zum Leitfaden fuer die Erforschung des menschlichen MHC, wobei sich in vielen Punkten Parallelen zum Maussystem bestaetigten.

Die Geschichte des HLA-Systems beim Menschen selbst begann mit der Entdeckung durch Dausset, dass manche Schwangerenseren die Leukozyten anderer Personen agglutinieren Auf der Basis dieser Reaktionsmuster wurde 1958 von Dausset das MAC-Antigen (heute HLA-A2) definiert (Dausset 1958). 1962 beschrieb van Rood ein dialleles System, das er 4 a/b nannte (van Rood 1962). Mit der Entdeckung weiterer Antigengruppen stellte sich die Frage nach der genetischen Organisation des menschlichen MHC. Ein 2-Locus-Modell wurde erstmals auf dem 3. Internationalen HLA-workshop aufgestellt (Dausset 1967) und 1970 auf dem 4. Internationalen HLA-workshop bestaetigt: HLA-A und HLA-B.

Spaeter kam ein dritter Locus, HLA-C, hinzu (Sandberg et al 1970).

Waehrend diese drei Loci serologisch definiert sind, das heisst durch agglutinierende oder zytotoxische Reaktion von Antiseren mit Antigenen, wurde ein weiterer Genlocus durch die Stimulationsfaehigkeit seiner Antihgene auf die Lymphozytenproliferation entdeckt. In der sogenannten gemischten Leukozytenkultur (MLC fuer "mixed leukozyte culture") stimulieren sich Lymphozyten mancher Individuen gegenseitig, auch wenn sie in ihrem HLA-A,B und C Typ uebereinstimmen (Bach et al 1967). Ein Polymorphismus stimulationsfaehiger Antigene wurde gefunden, heute genannt HLA-D.

Schliesslich liess sich ein weiterer Genort definieren, HLA-DR, dessen Produkte identisch oder assoziiert mit denen von HLA-D sind, die sich aber nicht lymphoyztaer wie HLA-D, sondern serologisch wie HLA-A,B und C nachweisen lassen.

Der aktuelle Stand der Kenntnisse ueber das HLA-System wurde im 8. internationalen HLA-workshop 1980 zusammengetragen (Terasaki 1980).

1.2.3 Genetik

Wie oben beschrieben ist die genetische Region des HLA-Systems in mehrere Genloci mit multipler Allelie eingeteilt. Die einzelnen bekannten Allele werden mit dem Kennbuchstaben des Genorts und einer fortlaufenden Nummen benannt, also zum Beispiel HLA-A2. Da der menschliche Chromosomensatz diploider Natur ist, also fuer jeden Genort ein muetterliches und ein vaeterliches Gen traegt, umfasst der Genotyp eines Menschen jeweils zwei Allele pro HLA-Locus.
Als Haplotyp ist die Gruppe von Allelen auf den verschiedenen HLA-Loci definiert, die als Einheit von der Mutter beziehungsweise vom Vater vererbt wird. Der HLA-Genotyp besteht also aus einem muetterlichen und einem vaeterlichen Haplotyp.

Ein haeufiger Phaenotyp ist zum Beispiel HLA A2,3 B12,35 Cw4,w5. Die zugehoerigen Haplotypen koennten sein HLA A2 B12 Cw5 und HLA A3 B35 Cw4.

Die Vererbung der HLA-Antigene folgt einem einfachen kodominanten Erbgang mit den Haplotypen als Vererbungseinheit.
Bezeichnet man den HLA-Chromosomensatz der Eltern vereinfacht als A/B fuer den Vater und C/D fuer die Mutter, so koennen bei den Kindern, von Rekombinationen abgesehen, vier HLA-Muster auftreten: A/C, A/D, B/C und B/D. Tatsaechlich findet man, dass von Kindern gleicher Eltern im Durchschnitt 25% einem dieser vier HLA-Typen zughoeren.

1.2.4 Gewebsverteilung

Fuer die vorliegende Arbeit relevant ist die Expression von HLA-Antigenen auf verschiedenen Koerpergeweben. Antigene des Locus HLA-A,B und C sind auf fast allen Zellen des menschlichen Organismus nachweisbar. Insbesondere werden sie bei den Blutzellen auf Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten exprimiert. Lymphozytenstimulierende Determinanten vom HLA-D Typ werden auf B-Lymphozyten und Monozyten nachgewiesen.

Serologisch definierte HLA-DR Antigene waren urspruenglich nur auf B-Lymphozyten erkennbar. Untersuchung von aktivierten T-Lymphozyten in den letzten Jahren zeigten auch hier die Expression von B-Zellspezifischen Antigenen. Dies fuehrt zum Thema der hier beschriebene Arbeit und wird im Punkt 1.4 naeher erlaeutert.

1.2.5 Funktion

Zum Abschluss dieser Betrachtung des HLA-Systems noch eine kurze Bemerkung ueber dessen Funktion.

Mit der Definition von "selbst"
steht das HLA-System am Ausgangspunkt jeder immunologischen Abwehrreaktion. Darueberhinaus bestehen weitere Verbindungen zum Immunsystem. Auf struktueller Ebene besteht Analogie zwischen Teilen der HLA-Molekuele mit Immunglobulinen. Auf genetischer Ebene wurden in der Umgebung der HLA-Region im Chromosom 6 weitere immunologisch bedeutsame Gene entdeckt (Stukturgene fuer die Komponenten C2, C4 und Bf des Komplementsystems).

Experimentell wurden die meisten Aussagen zur Funktion des MHC-Systems bei der Maus gewonnen. Hier zeigte sich, dass MHC-Antigene nicht nur eine Immunantwort ausloesen, sondern diese auch regulieren. So koennen T- und B-Zellen von verschiedenen Maeusen im Rahmen der Immunabwehr nur kooperieren, wenn sie in mindestens einem H-2 Haplotyp uebereinstimmen (Katz 1973).

Besondere Bedeutung kommt der Definition von funktionellen Untergruppen der T-Zell-Population zu, wie Suppressor- und Helferzellen. Im H-2 System der Maus sind Immunantwortgene bekannt, die selektiv auf T-Suppressor zellen exprimiert werden. In juengerer Zeit wurden bei der Maus allospezifische Differenzierungsantigene gefunden, die nur auf bestimmten Differenzierungsstufen von T-Zellen exprimiert werden. Diese sogenannten Qa-Antigene werden durch die Tla Region auf Chromosom 17 des Maus-MHC kontrolliert (Klein et al 1978, Haemmerling et al 1979).

Der Nachweis analoger Antigene beim Menschen waere von Bedeutung fuer die Definition verschiedener funktioneller
Untergruppen in der T-Zell-Population. Die Untersuchung der Antigen-expression aktivierter Lymphozyten zielt in diese Richtung.

1.3 Mitogene

1960 wurde erstmals beobachtet, dass ein Extrakt der Feuerbohne (Phaseolus vulgaris) in der Lage ist, grosse, sich teilende, blastenfoermige Zellen in einer Kultur peripheren menschlichen Blutes hervorzurufen (Nowell 1960). Dieser Stoff wurde Phytohaemagglutinin (PHA) genannt, nach seiner schon frueher bekannten Eigenschaft, Erythrozyten zu agglutinieren.

Bald darauf wurde gezeigt, dass die Vorlaeuferzellen der PHA-induzierten Blasten periphere Blutlymphozyten waren.

Weitere Aktivatoren kamen hinzu, wie Concavalin A, Pokeweed Mitogen und bestimmte bakterielle Stoffwechselprodukte. Das grosse Interesse an dieser als Mitogene bezeichneten Stoffgruppe ruehrte von der Beobachtung, dass die morphologischen und biochemischen Veraenderungen bei der mitogeninduzierten Lymphzytenantwort in vitro weitgehend mit denen bei der antigeninduzierten Immunreaktionen uebereinstimmen.

Bis jetzt gibt es keinen Anhaltspunkt fuer eine qualitativen Unterschied bei den biochemischen und physiologischen Veraenderungen zwischen der Lymphozytenaktivierung durch unspezifische Aktivatoren, wie Mitogene, und spezifische Aktivatoren, wie Antigene oder gemischte Lymphozytenkulturen bei vorsensitivierten Lymphozyten. So wird die in vitro Stimulation von Lymphozyten mit Mitogenen heute allgemein als Modell fuer den entsprechenden in vivo Aktivierungsvorgang akzeptiert.

Der Mechanismus der Mitogenaktivierung ist nicht vollstaendig bekannt. Der initiale Schritt ist eine Bindung des Mitogens an Oberflaechen-rezeptoren. Dies fuehrt innerhalb der ersten ein bis zwei Stunden zu biochemischen Veraenderungen wie erhoehter Umsatz von Membranphospholipiden und Anstieg der cAMP Konzentration. Gesteigerte Synthese von Nukleinsaeuren laesst sich durch Inkorporation von Tritium-markiertem Thymidin messen und bietet so ein quantitatives Mass fuer den Aktivierungsgrad der Kultur.

Morphologische Veraenderungen erreichen mit einem Blastenanteil bis zu 60% (abhaengig von der Mitogenkonzentration) ihren Hoehepunkt um den vierten Tag. Parallel dazu setzt eine Zellteilung der Lymphozyten ein. Dadurch wird voruebergehend der Verlust an Zellen durch Zelltod mehr als kompensiert, was zu einer Erhoehung der Zellzahl fuehrt.

Ausfuehrliche Untersuchungen der Kulturbedingungen mit PHA (Leventhal et al 1967, Handmaker et al 1967) haben folgende relevante Parameter bestimmt: Art des Mitogens, Konzentration des Mitogens, Zelldichte bezogen auf Volumen des Kulturmediums, Zelldichte bezogen auf Bodenflaeche des Kulturgefaesses auf der sich die Lymphozyten absetzen und schliesslich Dauer der Zellkultur.

Bei der vorliegenden Arbeit wurden diese Kulturparameter in Anlehnung an die in der Literatur beschiebenen Methoden zur Untersuchung von Antigenexpression stimulierter Lymphozyten gewaehlt (Kim et al 1980, Gazit et al 1980).

Als Mitogen diente Leucoagglutinin (Phamacia Fine Chemicals), der chemisch rein dargestellte Wirkstoff des PHA (Weber et al 1967, Rasanen et al 1973). PHA wirkt selektiv auf T-Lymphozyten: T-Lymphozyten werden stark aktiviert, waehrend B-Lymphozyten durch PHA nur sehr schwach oder ueberhaupt nicht aktiviert werden (Janossy et al 1971).

1.4 Bisherige Erkenntnisse ueber Antigenexpression auf stimulierten T-Lymphozyten

HLA-DR Antigene wurden, wie oben beschrieben, urspruenglich nur auf peripheren B-Lymphozyten nachgewiesen. Spaeter konnte zusaetzlich die Expression von HLA-DR Antigenen auf menschlichen T-Lymphozyten nachgewiesen werden, welche in vitro durch pflanzliche Mitogene (Ko et al 1979, Greaves et al 1979, DeWolf et al 1979), loesliche Antigene (Ko et al 1979, Greaves et al 1979) oder durch allogene Lymphozytenstimulation (Suciu-Foca et al 1978, DeWolf et al 1979 Greaves et al 1979) stimuliert waren.

Die meisten dieser Autoren betonen, dass die HLA-DR Antigene der aktivierten T-Zellen mit den HLA-DR Antigenen auf ruhenden B-Zellen desselben Zellspenders uebereinstimmen.

Einige Autoren erwaehnen die Beobachtung von sogenannten "Extra"-Reaktionen (Suciu-Foca et al 1979, DeWolf et al 1979, Greaves et al 1979). Damit sind Reaktionen von Seren gemeint, welche positiv mit aktivierten T-Zellen aber negativ mit B-Zellen desselben Individuums reagieren.

In den letzten Jahren haben drei Arbeitsgruppen diese "Extra"-Reaktionen naeher untersucht. Gazit et al beschreiben zwei menschliche Antiseren, die spezifisch mit mitogenaktivierten T-Lymphozyten mancher Spender reagieren (Gazit et al 1980a, Gazit et al 1980b). Die Autoren schlagen ein neues Alloantigensystem vor (HT fuer "human T-Lymphozyte") welches Analogien zum Antigensystem der Tla Region bei der Maus aufweist. Kim et al (1980) untersuchen die Haeufigkeit von "Extra"-Reaktionen mitogenaktivierter Lymphozyten bei Gruppen von vorausgewaehlten Schwangerenseren. Gerbase de Lima et al (1981) bestaetigen das Auftreten von "Extra"-Reaktionen in gutkontrollierten Untersuchungen von alloaktivierten T-Lymphozyten. Eine detaillierte Beschreibung dieser Ergebnisse folgt im Abschnitt 4.3 der Diskussion.

1.5 Eigene Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das oben beschriebene Phaenomen von "Extra"-Reaktionen zu untersuchen. Dabei wurde nach Seren gesucht, die mit aktivierten T-Lymphozyten positiv, mit den frischen T- und B-Lymphozyten desselben Spenders aber negativ reagieren. Durch solche Seren koennten blastenspezifische Antigene definiert und ihre Beziehung zum HLA-System beschrieben werden.

Konkrete Einzelaufgaben dabei waren:

a) Etablierung eines verlaesslichen Zellkultursystems zur Gewinnung mitogenaktivierter T-Lymphozyten.

b) Testung von Antiseren mit aktivierten und nicht-aktivierten T-Lymphozyten, um Veraenderungen der Antigenexpression waehrend des Aktivierungsschritts zu definieren.

c) Zusaetzliche Kontrolle mit unstimulierten B-Lymphozyten, um beobachtete T-Blastenreaktionen als Expression von DR-Antigenen oder als blastenspezifische Reaktionen einstufen zu koennen.

d) Testung von Seren, welche blastenspezifische Reaktionen zeigen, mit mehreren Mitgliedern einer Familie zur Beschreibung des Erbgangs der verantwortlichen Antigene.

2. MATERIALIEN UND METHODIK

2.1 Uebersicht

Der experimentelle Teil der Untersuchungen bestand aus folgenden Teilschritten:

a) Auswahl der Seren
b) Absorption der Seren mit Thrombozyten
c) Auswahl der Zellspender
d) Separation von Lymphozyten aus peripherem Venenblut
e) Stimulation von Lymphozyten in Kultur
f) Anreicherung von lebenden Lymphozyten
g) Anreicherung von B-Lymphozyten
h) Lymphozytotoxizitaetstest
i) Messung des Aktivierungsgrads von Lymphozyten

Im folgenden werden zugrundeliegende Materalien und Methoden dieser einzelnen Teilschritte beschrieben.

2.2 Auswahl der Seren

Zwei Gruppen von menschlichen Seren wurden untersucht. In der ersten Reihe von Experimenten wurden insgesamt 298 unausgewaehlte Schwangerenseren getestet. Dies waren Seren von weiblichen Blutspendern mit mindestens einer vorausgegangenen Schwangerschaft.

In der zweiten Reihe von Experimenten wurden 54 Seren mit DR-Aktivitaet untersucht, welche zuvor mit Thrombozyten absorbiert waren. Darunter waren Seren mit bekannter DR-Spezifitaet, welche als Typisierungsseren verwendet werden, Seren mit fraglicher DR- Spezifitaet und Seren, die multispezifisch oder mit nicht eindeutig festgelegter Spezifitaet mit B-Zellen positiv reagierten. Auch diese Seren stammten von weiblichen Blutspendern mit mindestens einer vorausgegangenen Schwangerschaft.

2.3 Absorption von Seren

Um die Reaktion eines Serums mit Antigenen vom Typ HLA-A,B und C getrennt von Reaktionen mit anderen Antigenen betrachten zu koennen, ist es notwendig, Antikoerper gegen Antigene vom Typ HLA- A,B und C aus einem Serum selektiv zu entfernen. Dies geschieht durch Absorption mit einer stark angereicherten Suspension von Thrombozyten.

Thrombozyten exprimieren auf ihrer Oberflaeche die HLA-A,B,C-Antigene des jeweiligen Spenders. Werden gepackte Thrombozyten mit dem zu absorbierenden Serum in Kontakt gebracht, so stellt sich ein Gleichgewicht zwischen freien und gebundenen Antikoerpern ein. Durch einen Ueberschuss an Thrombozytenoberflaeche als Bindungsstelle, durch Abzentrifugieren der Thrombozyten und durch Wiederholen dieses Absorptionsvorgangs wird dem Serum die entsprechende HLA-Aktivitaet weitgehend entzogen.

Im einzelnen bestand das Absorbtionsprotokoll aus folgenden Schritten:

a) Nach und nach wird von verschiedenen Spendern gewaschenes Thrombozytenkonzentrat gesammelt bis ein Pool von Thrombozyten etwa 60 verschiedener Spender besteht.

b) Das Thrombozytenkonzentrat soll bei Kuehlung (+4 oC) in NaCl-Loesung mit 0,1% Acid mindestens zwei Monate gelagert werden. Dabei sterben verunreinigende Zellarten mit hoeherer Stoffwechselrate, wie Lymphozyten und Erythrozyten, ab.

c) Am Tage der Verwendung werden die Thrombozyten nochmals gewaschen (Verduennen mit NaCl-Loesung, Zentrifugation bei 2500 g fuer 40 min Absaugen des Ueberstandes und Resuspension in NaCl-Loesung im Verhaeltnis 1:1).

d) Von dieser gewaschenen Thrombozytensuspension werden pro 1 ml zu absorbierendes Serum 1,5 ml in je ein zentifugationsstabiles 15-ml-Plastikroehrchen gegeben.

e) Zentrifugation dieses Roehrchens (40 min, 3000 g) und Absaugen des Ueberstands. Jetzt liegt in jedem Roehrchen am Boden ein Satz von etwa 0,75 ml gewaschenem und gepacktem Thrombozytengemisch vor.

f) Auf die gepackten Thrombozyten wird 1 ml des zu absorbierenden Serums gegeben, das Gemisch wird gut resuspendiert und bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert.

g) Lagern des Gemischs bei Kuehlung (+4 oC) fuer ca. 24 Stunden.

h) Am Folgetag Gemisch Zentifugieren (40 min, 3000 g), Serum abheben und auf einem frischen Volumen von gepackten Thrombozyten, wieder wie in c) bis e) vorbereitet, den Absorptionsvorgang f) wiederholen.

i) Am Ende der 2-Stunden Inkubationszeit das Gemisch zentifugieren, das Serum abheben und in markierte Roehrchen ("absorbiert") fuellen.

2.4 Auswahl der Zellspender

Es wurden Lymphozyten von insgesamt 17 gesunden Zellspendern untersucht. Darunter waren 4 unverwandte Einzelspender, ein Vater-Sohn-Paar, ein Mutter-Tochter-Paar, sowie eine Familie mit 3 und eine Familie mit 6 Angehoerigen.

2.5 Separation von Lymphozyten

Lymphozyten wurden aus venoesem Blut mit Hilfe der Ficoll-Isopaque Methode gewonnen (Boyum, 1968), die hier beschrieben wird. Als Arbeitsplatz diente eine sterile Abzugshaube. Sterilitaet bei der Zelltrennung war Voraussetzung fuer die kontaminationsfreie Kultur waehrend der Stimulationsphase.

Das Protokoll der Lymphozytenseparation bestand aus folgenden Schritten:

a) Vorbereitung des Waschmediums

Waschmedium wurde bei der Isolierung der Lymphozyten und in den Waschvorgaengen vewendet. Es wurde wie folgt zubereitet:

50 ml Medium TC 199 (Gibco Nr.118EE), 10-fach konzentriert
15 ml Hepespuffer ph 7,3 1M (Gibco Nr.563)
4,5 ml NaOH 1M
0,5 ml (5000 IE) Heparin (Novo)
50 000 E Penicillin und 50 000 ug Streptomycin (5 ml von Gibco Nr. 514)
Aqua dest. ad 500 ml

b) Vorbereitung des Kulturmediums

Kulturmedium wurde fuer alle Kulturen benutzt und wie folgt zubereitet:

500 ml Medium RPMI 1640 (Gibco Nr.240)
50 000 E Penicillin und 50 000 ug Streptomycin (5 ml von Gibco Nr. 514)
146 ug L-Glutamin (5 ml von Gibco Nr.503)

Am Tag des Verbrauchs wurde diesem Medium 10% gepooltes menschliches Serum zugefuegt.

c) Am Vortag der Zellseparation werden pro Spender ca. 30 ml Venenblut steril abgenommen. Zur Antikoagulation Zugabe von 0,1 ml Heparin-loesung/10 ml Blut (Heparin Novo 5000 IE/ml).

d) Aufbewahren des Blutes bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur (12 bis 24 Stunden).

e) Verduennen des Bluts mit Waschmedium im Verhaeltnis 1:1.

f) Verteilen des verduennten Blutes auf Glasroehrchen (50 ml Spitzboden), maximal 30 ml pro Roehrchen.

g) Langsames Unterschichten von 10 ml Ficoll/Natriummetrizoat-Loesung (Lymphoprep, Nyegaard) mit langer Kanuele. Dabei ergibt sich eine glatte Grenzschicht zwischen Trennmedium und verduenntem Blut.

h) Zentrifugation fuer 20 min bei 400 g.

i) Abheben des gebildeten Zellrings (Bereich angereicherter mononuklearer Zellen und Thrombozyten an der Mediumgrenzschicht) und Verduennen mit Waschmedium im Verhaeltnis mindestens 2:1.

j) Auswaschen von Trennmedium und Thrombozyten durch dreimaliges Zentrifugieren und Resuspendieren in frischem Waschmedium (15 min, 10 min und 10 min bei 300 g).

k) Nach der letzten Zentrifugation wird das Zentrifugat in Kulturmedium resuspendiert (ca. 1 ml pro 10 ml urspruengliches eingesetztes Blut).

l) Bestimmung von Zellzahl und Viabilitaet mit Eosinrot in der Neubauer-Zaehlkammer. Dabei werden tote Zellen durch Aufnahme des Farbstoffs Eosin erkennbar.

Nach diesem Arbeitsgang verfuegt man ueber eine mit Lymphozyten angereicherte Suspension, gereinigt von Thrombozyten und Lymphoprep-Verunreinigungen durch den mehrmaligen Waschgang. Diese Suspension kann je nach weiterem Verwendungszweck zur direkten Testung mit Antiseren oder zur Lymphozytenstimulation in Kultur eingesetzt werden.

2.6 Aktivierung von Lymphozyten in Kultur

a) Die mit Lymphozyten angereicherte Suspension wird mit Kulturmedium (plus 10% gepooltes Humanserum) auf eine Zellkonzentration von 1*10 hoch6 Zellen / ml Kulturmedium verduennt.

b) Aufteilen dieser Suspension auf drei Teile zu gleichen Teilen.

c) Ein Teil wird ohne Mitogen als Kontrolle (PHA=0 ug/ml) in Kultur angesetzt. Zu den anderen beiden Teilen wird PHA-Loesung zugegeben fuer eine Endkonzentration von 2 bzw. 4 ug/ml. PHA wurde als hochgereinigter, elektrophoretisch homogener Wirkstoff verwendet (Leucoagglutinin, Pharmacia Fine Chemicals).

   Diese PHA-Form wurde als 5 mg gefriergetrocknetes Pulver geliefert. Aufloesung in 100 ml NaCl Loesung ergab 100 ml PHA-Loesung mit 50 ug PHA / 1 ml. Dies wurde in 20 Chargen zu 5 ml bei -20 oC tiefgefroren und zur Verwendung jeweils getrennt wiederaufgetaut.

d) Die Zellsuspensionen verschiedener PHA-Konzentration wurden auf Kulturplatten mit 6 Vertiefungen, Durchmesser 3,6 cm, verteilt (Tissue culture cluster 6, Costar Nr.3506).

e) Inkubation im Inkubator bei 37 oC und 5% CO2-Atmosphaere fuer 6 Tage. Waehrend der Inkubation mindestens einmal Kontrolle im Lichtmikroskop auf Kontamination, erkennbar zum Beispiel durch Pilzmycelbildung.

f) Zum Abschluss der Inkubation Resuspension der Zellen im Kulturgefaess, Ueberfuehren in Zentrifugationsroehrchen (15 ml Spitzboden mit Schraubverschluss, Falcon Nr.2095) und Waschen mit Waschmedium (15 min, 300 g).

g) Bestimmung von Zellzahl und Viabilitaet in der Neubauer-Zaehlkammer mit Eosinrot.

2.7 Anreicherung von lebenden Lymphozyten

Im Laufe der Zellkultur stirbt ein gewisser Prozentsatz der Zellen ab, eventuell verstaerkt durch toxische Einfluesse des Mitogens. Fuer die Untersuchung der Antigene stimulierter Lymphozyten im Lymphozytotoxizitaetstest ist ein moeglichst hoher Anteil lebender Lymphozyten entscheidend. Der hohe Hintergrundswert an toten Zellen zum Abschluss der Zellkultur stellte ein Hauptproblem im beschriebenen Versuchsprotokoll dar.

In der Literatur sind Methoden zur Anreicherung lebender Zellen in lymphoiden Zellsuspensionen beschrieben (Davidson et al 1974). Bei den hier beschriebenen Experimenten wurde bei Auftreten niedriger Viabilitaetswerte am Ende einer Kultur folgendes modifizierte Trennverfahren verwendet (mitgeteilt von Dr. Dolores Schendel, Institut fuer Immunologie, Universitaet Muenchen).

a) 4 ml Ficoll (spezifische Dichte 1,077) in Zentrifugationsroehrchen (15 ml Spitzboden mit Schraubverschluss, Falcon Nr.2095) geben.

b) Zellsuspension ueberschichten. Das ueberschichtete Volumen kann zwischen 2 ml und 4 ml liegen. Die Zellkonzentration soll zwischen 0,5 und 4,0*10 hoch6 Lymphozyten / ml liegen.

c) Zentrifugation fuer 15 min bei 2000 g. Man benoetigt eine starke Zentrifuge, die schnell beschleunigt. Waehrend der Zentrifugation wandern die toten Zellen und Zellfragmente zum Boden des Gefaesses. Die lebenden Lymphozyten bleiben an der Grenzflaeche Ficoll/Medium und bilden einen weissen Ring.

d) Zellring an der Grenzflaeche abheben, mit 5 ml Waschmedium verduennen, 10 min bei 200 g zentrifugieren und die Zellen in 0,5 ml Kulturmedium resuspendieren.

e) Bestimmung von Zellzahl und Viabilitaet durch Zugabe von 50 ul Trypanblau 0,5 % zu 50 ul Zellsuspension und Auszaehlung in der Neubauer-Zaehlkammer.

2.8 Anreicherung von B-Lymphozyten

DR-Antigene werden auf B-Lymphozyten, nicht aber auf T-Lymphozyten exprimiert. Zur Testung von Seren mit Aktivitaet gegen DR-Antigene sind moeglichst angereicherte Suspensionen von B-Zellen Voraussetzung.

Die meisten Methoden zur Trennung von T- und B-Zellen aus unseparierten peripheren Blutlymphozyten benuetzen unterschiedliche Adsorptionsfaehigkeiten dieser beiden Zellgruppen. Der hier verwendeten Methode (nach Danilovs et al 1980) liegt die spezifische Adhaerenzfaehigkeit von B-Lymphozyten an Nylonwolle zugrunde.

a) Praeparation von Plastiktrinkhalmen (Durchmesser 0,6 cm):

- Trinkhalm auf 14 cm Laenge zuschneiden
- Ein Ende im 45 o Winkel zuschweissen
- 0,1 g Nylonwolle (Fenwal) in RPMI 1640 Medium traenken und mit Pinzette auseinanderziehen
- Nylonwolle gleichmaessig in Trinkhalm stopfen bis auf eine Hoehe von 6 cm
- Untere Spitze des Strohhalms aufschneiden

b) Zellseparation:

- Lymphozytensuspension auf 1 ml konzentrieren
- Zwei praeparierte Tinkhalme pro Person, Zellsuspension und Medium (RPMI 1640) auf 37 oC ewaermen
- Trinkhalm einmal mit 5 ml Medium durchspuelen
- Je 0,5 ml Zellzuspension auf die Watte geben
- 15 min bei 37 oC inkubieren
- Trinkhalm zweimal mit je 5 ml Medium auffuellen und austropfen lassen -> T-Zell-angereicherte Suspension
- Nochmals 1,5 ml Medium auf die Watte geben, mit Pinzette sehr fest ausquetschen und diesen Vorgang einmal wiederholen -> B-Zell-angereicherte Suspension

Im folgenden wird eine mit B-Lymphozyten angereicherte Suspension kurz als B-Zellen bezeichnet. Analoges gilt fuer T-Zellen.

2.9 Lymphozytotoxizitaetstest

Im Lymphozytotoxizitaetstest wird die zytotoxische Aktivitaet von Antiseren gegen Lymphozyten bestimmt. Dabei werden zuerst Lymphozytensuspension und Serum vermischt. Antikoerper im Serum binden sich spezifisch an Antigene auf der Zelloberflaeche.

Zugabe von Komplement in Form von Kaninchenserum fuehrt bei Antigen-Antikoerper-Reaktion zur Komplementaktivierung mit resultierender Zytolyse.

Lysierte Zellen nehmen der zugegebenen Farbstoff Eosinrot auf. Durch Zugabe von Formalin wird die Reaktion fixiert. Im Mikroskop wird der Prozentsatz von lysierten Zellen (durch Eosinrot dunkel gefaerbt) abgeschaetzt und damit ein Mass fuer die toxische Aktivitaet dieser bestimmten Serum-Lymphozyten-Kombination gefunden.

Bei bekannter Serumspezifitaet lassen sich damit Aussagen ueber die Antigene auf den Testzellen treffen und umgekehrt.

Die Technik des Tests wurde in Mikrolymphozytotoxizitaetstest (Terasaki et al 1964) verfeinert. Er wird heute in fast allen Gewebetypisierungslabors angewandt und vereinigt die Vorteile von einfacher Durchfuehrung, geringem Verbrauch an Serum und hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Im Prinzip laeuft dabei die serologische Reaktion in einem minimalen Volumen, vor Austrocknen durch einen Oeltropfen geschuetzt, am Boden der Vertiefung einer Mikrotestplatte ab. Die Mikrotestplatte vereinigt 60 separate Reaktionsansaetze auf kleinem Raum und erlaubt so die effektive Zugabe von Reagentien mit halb- bis vollautomatischem Geraet.

Hier die einzelnen Schritte im Detail:

a) Vorbereitung der Testplatten:

- In Mikrotestplatten (Greiner) mit 60 Vertiefungen werden pro Vertiefung 5 ul dickfluessges Paraffinoel eingetropft.
- Pro Vertiefung wird 1 ul Antiserum unter das Oel eingespritzt.
- Vorbereitete Platten koennen bei -80 oC in der Tiefkuehltruhe aufbewahrt werden und werden vor dem Test aufgetaut.

b) Reaktionsablauf (angegebene Mengen jeweils pro Vertiefung):

- Die Zellsuspension, frisch separiert oder aus Zellkultur, wird durch Zentrifugation und Resuspension im Waschmedium (siehe 2.5) auf eine Zellkonzentration von 2000/ul eingestellt.
- 1 ul Zellsuspension wird unter das Paraffinoel zum bereits eingegebenen Serum eingespritzt. Gelegentlich vereinigen sich Serumtropfen und Zellsuspensionstropfen nicht spontan. Dann werden durch Einstechen in die Vertiefung mit sauberer Pipettenspitze die beiden Tropfen vereinigt.
- Inkubation fuer 30 min bei Raumtemperatur.
- Zugabe von 5 ul Kaninchenserum (als Komplementquelle).
- Inkubation fuer 60 min bei Raumtemperatur.

- Zum Abschluss Zugabe von 5 ul Eosin (5-prozentige waessrige Loesung) zur Anfaerbung und nach mindestens zwei Minuten Faerbezeit Zugabe von 5 ul Formalin zur Fixierung.

- Die Mikrotestplatte wird vorsichtig mit einem duennen Glasplaettchen bedeckt.

c) Ablesen des Reaktionsergebnisses

- Die Platten sollen vor dem Ablesen moeglichst ca. 12 Stunden bei Kuehlung aufbewahrt werden. Dabei setzen sich die Zellen am Boden der Vertiefung ab, liegen so in einer Ebene und und lassen sich im Mikroskop bei einer Scharfeinstellung ueberblicken.

- Ablesung erfolgt im umgekehrten Phasenkontrastmiktroskop (Zeiss). Lebende Zellen erscheinen hell leuchtend, lysierte Zellen erscheinen dunkel angefaerbt.

- Als negative Kontrolle ist jede Testplatte mit einem sogenannten Nullserum ohne zytotoxische Aktivitaet bestueckt. Der Anteil lysierter Zellen in der entsprechender Vertiefung gibt ein ein Mass fuer den Hintergrund an toten Zellen, unabhaengig von spezifischer serologischer Reaktion.

- Als positive Kontrolle dient ein multispezifisches Serum, welches mit Lymphozyten jedes Spenders reagiert. 100 % lysierte Zellen in der entsprechenden Vertiefung bestaetigen adaequate Zytolysebedingungen, besonders ausreichende Komplementaktivitaet.

- Fuer die abzulesenden Reaktionen wird der Anteil spezifisch lysierter Zellen geschaetzt und auf eine fuenfstufigen Skala bewertet. Dabei bedeutet:

0	= keine Reaktion
+	= 10- 20 % lysierte Zellen
++	= 20- 50 % lysierte Zellen
+++	= 50- 75 % lysierte Zellen
++++	= 75-100 % lysierte Zellen

Entsprechend wird die Lymphozytotoxizitaet eines Zell-Serum-Paares im Kapitel "Ergebnisse" jeweils abgekuerzt als LZT = 0, 1, 2, 3 bzw. 4.

2.10 Messung des Aktivierungsgrads von Lymphozyten

Zur Beurteilung des Ansprechens der Lymphozyten auf den Stimulus des Mitogens wird ein Parameter benoetigt, der die Proliferation der Lymphozyten quantifiziert.

Als solcher Parameter wird die intrazellulaere Replikationsrate von Nukleinsaeuren benutzt, experimentell messbar durch die Inkorporation von radioaktiv markiertem Thymidin.

Dabei wird zu einer kleinen Probe der aktivierten Zellsuspension nach bestimmter Stimulationszeit tritiummarkiertes Thymidin (im Text abgekuerzt: *T) als Zusatz gegeben.
Nach 4 Stunden Inkubationszeit wird die Zellsuspension vom Ueberstand durch einen Filter getrennt. Die intrazellulaer aufgenommene Radioaktivitaet wird gemessen.

Die Schritte im einzelnen:

a) Aus der Zellkultur werden nach Resuspension Zellproben von je 50 ul in drei Vertiefungenen einer Mikrotiter-Platte (Limbro Nr. 76.014.05) uebertragen. Der Assay wird in dreifacher Kontrolle aufgesetzt.

   Alternativ dazu koennen schon zu Beginn der Zellkultur dreimal 100 ul Zellsuspension parallel zur Hauptkultur in Mikrotiter-Platten mitangesetzt werden. Dadurch wird eine Beeinflussung der fortlaufenden Hauptkultur durch Resuspension und Probenentnahme vermieden.

b) Den Zellproben wird pro Mikroplattenvertiefung 1,6 uCi *T in 50 ul Kulturmedium zugegeben (Spezifische Aktivitaet 40-60 Ci/mM, Radiochemical Center, Amersham, Nr. TRK 418).

c) In diesem radioaktiv angereicherten Medium werden die Zellproben unter normalen Kulturbedingungen (37 oC; 5% CO2) fuer 4 Stunden weiterinkubiert.

d) Nach Ablauf dieser 4 Stunden wird die Inkubation unterbrochen, entweder durch voruebergehendes Aufbewahren der Zellproben bei 4 oC (Kuehlschrank) oder durch sofortige Weiterverarbeitung wie im naechsten Punkt beschrieben.

e) Mit Hilfe eines Otto-Hiller-Erntegeraets werden die Zellproben auf einen Glasfaserfilterstreifen (Whatman Nr. 934 AH) uebertragen. Das Kulturmedium wird dabei durch das Filtermaterial durchgesogen, die Zellen bleiben haengen.

f) Die Filterstreifen werden in einem Autoklavierofen bei 120 oC fuer 20 min getrocknet.

g) Die jeweils einer Zellprobe entsprechenden Filterabschnitte werden in Zaehlroehrchen (Wheaton Nr. 986644) verteilt und Toluol-Szintillationsloesung wird hinzugegeben.

h) Die in den Zellen aufgenommene Radioaktivitaet wird im Szintillationszaehler (Packard, Modell Tri-Carb) in der Einheit cpm ("counts per minute") gemessem.

i) Bei Dreifachmessung zaehlt der mittlere der drei Werte. Bei Zweifachmessung zaehlt der arithmetische Mittelwert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Methodologische Ergebnisse - Etablierung eines Zellkultursysyems

3.1.1 Parameter der Zellkultur

Der Zustand einer Lymphozytenkultur zu einem bestimmten Zeitpunkt laesst sich am besten durch drei Messgroessen beschreiben:

- Die Zellproliferation, gemessen an der *T-Inkorporation;
- Der Blastenanteil, d.h. der Anteil an transformierten Lymphozyten, die im Mikroskop als vergroesserte Zellen erkennbar sind;
- Die Viabilitaet, d.h. der Anteil lebender Zellen, durch Eosinanfaerbung in der Neubauer-Zaehlkammer bestimmt.

Angestrebt werden Kulturbedingungen, die zu einem hohen Blastenanteil bei moeglichst geringem Anteil an toten Zellen fuehren.

In der Literatur sind eine Vielzahl relevanter Kulturparameter angegeben, die auf diese Groessen Einfluss nehmen. Die wichtigsten darunter sind Art und Konzentration des Mitogens, Zelldichte und schliesslich Dauer der Zellkultur.

Es wird betont, dass die Kulturbedingungen, unter anderem wegen der unterschiedlichen Aktivitaet verschiedener Mitogenchargen, nur schwer von Labor zu Labor zu uebertragen sind. Deshalb muessen wichtige Kulturparameter wie Mitogenkonzentration und Stimulationsdauer jeweils fuer das eigene Testsystem etabliert werden.

Im folgenden soll die Abhaengigkeit der drei Messgroessen *T-Inkorporation, Blastenanteil und Viabilitaet von den Hauptparametern Mitogenkonzentration und Stimulationsdauer untersucht werden.

3.1.2 3H-Thymidininkorporation (im Text abgekuerzt: *T-Inkorporation)

Fuer vier fortlaufende Experimente am Anfang der Untersuchungen wurde die *T-Inkorporation zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen (Methode siehe 2.10).

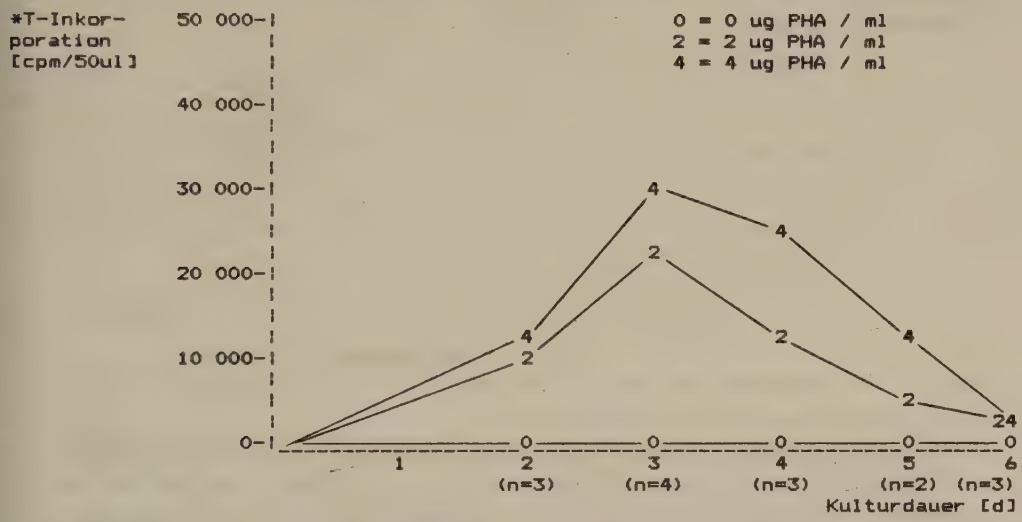
Tab. 1 gibt die Rohdaten gemessen in cpm (counts per minute) wieder. Der angegebene cpm-Wert ist wie folgt ermittelt: Bei Zweifachmessung zaehlt das arithmetische Mittel, bei Dreifachmessungen zaehlt der mittlere der drei Werte (Median). Die so ermittelte Zahl wird zur besseren Uebersicht auf ein Vielfaches von Hundert gerundet. Der Hintergrundswert (Messung eines leeren Roehrchens im Szintillationszaehler) war immer kleiner als 100 cpm.

TAB. 1
3H-Thymidininkorporation der Lymphozytenkulturen von 4 verschiedenen Spendern, bei variabler PHA-Konzentration und Kulturdauer (Inkorporationsaktivitaet von 50 ul Probevolumen; naeheres zur Methode siehe 2.10).

Spender	PHA-Konzentration [ug/ml]	Kulturtag 2	3	4	5	6
G.K.	0	100	---	---	---	---
	2	12700	35000	---	7600	---
	3	3700	27400	---	13000	---
	4	15800	37600	---	20600	---
R.F.	0	100	200	100	---	100
	2	9000	20500	18200	---	2800
	3	8800	13900	19000	---	2300
	4	9200	18900	22000	---	4400
I.T.	0	100	100	100	---	100
	2	6600	8500	9600	---	3500
	3	9600	18700	28000	---	---
	4	10200	22000	37200	---	3100
U.E.	0	---	100	100	200	300
	1	---	5900	2800	1200	600
	2	---	30100	12900	3300	900
	4	---	46100	13100	3600	900
Durchschnittswerte (n)	0	100 (3)	100 (3)	100 (3)	200 (1)	200 (3)
	1	---	5900 (1)	2800 (1)	1200 (1)	600 (1)
	2	9430 (3)	23500 (4)	13600 (3)	5500 (2)	2400 (3)
	3	7400 (3)	20000 (3)	24000 (2)	1300 (1)	2300 (1)
	4	11700 (3)	31100 (4)	24100 (3)	12100 (2)	2800 (3)

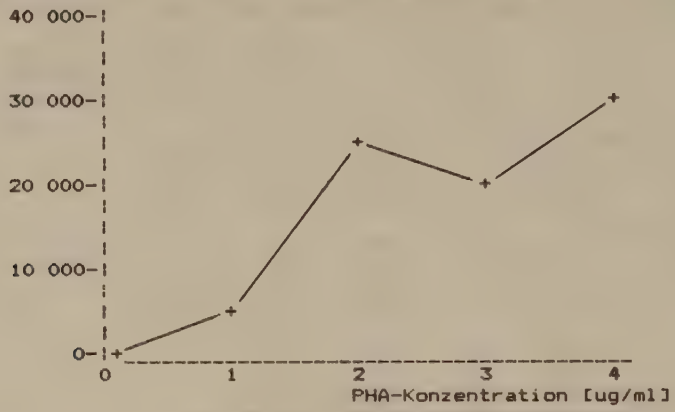
Die Daten der Tab. 1 sind auszugsweise in Abb. 1 graphisch zusammengefasst. Dabei wird die zeitliche Abhaengigkeit der *T-Inkorporation fuer die PHA-Konzentrationen 0, 2, und 4 ug/ml aufgezeichnet.

ABB. 1
3H-Thymidininkorporation der Lymphozytenkulturen in Abhaengigkeit von PHA-Konzentration und Kulturdauer (Durchschnittswert von 4 Spendern; Daten aus Tab.1; nicht fuer alle 4 Spender liegen an jedem Kulturtag Messwerte vor, z.B. fuer Tag 2: n=3).



In Abb. 2 sind nochmals Daten aus Tab. 1 graphisch dargestellt. Hier wird fuer Tag 3 (Zeitpunkt der maximalen durchschnittlichen Aktivitaet) die Abhaengigkeit der *T-Inkorporation von der PHA-Konzentration gezeigt.

ABB. 2
Abhaengigkeit der durchschnittlichen 3H-Thymidininkorporation von der PHA-Konzentration des Kulturmediums (Daten aus Tab. 1).



Interpretation der obigen Abbildungen:

a) Es zeigt sich eine, fuer die verwendete Messmethode, zufriedenstellende Uebereinstimmung der 4 Zellkulturen in der Kinetik der *T-Inkorporation.
b) Das Maximum der *T-Inkorporation liegt am 3. Tag. Am 6. Tag ist sie auf minimale Werte (<5% der maximalen Aktivitaet) zurueckgegangen.
c) Bezueglich der Abhaengigkeit von der PHA-Konzentration zeigt sich fuer PHA 0 ug/ml keine *T-Inkorporation. Die Werte fuer 2, 3 und 4 ug PHA / ml. liegen im Bereich zwischen 20 000 und 30 000 cpm, waehrend bei PHA 1 ug/ml nur ein Viertel dieser Aktivitaet erreicht wird. Dies laesst darauf schliessen, dass 1 ug PHA / ml noch keine maximale Aktivierung der Lymphozyten bewirkt, waehrend ab 2 ug PHA / ml eine gewisse Saettigung erreicht wird.

Vergleich mit der Literatur, z.B. einer Veroeffentlichung ueber Kinetik der PHA-Stimulation von menschlichen Lymphozyten (Handmaker et al 1967) zeigt aehnliche Ergebnisse. Auch hier ergab sich ein Aktivitaetsmaximum am 3. Tag. Zu diesem Zeitpunkt fuehrte eine PHA-Konzentration von 20 ul/ml zu den hoechsten Werten, die bei niedrigeren und hoeheren Konzentrationen nicht erreicht wurden. Die unterschiedliche Optimalkonzentration laesst sich wahrscheinlich durch die Verwendung eines weniger gereinigten Mitogenpraeparates erklaeren.

3.1.3 Anteil lebender Zellen - Toxizitaet der Kulturbedingungen

Die Aussagekraft des Lymphozytotoxizitaetstests haengt von einer moeglichst hohen Viabilitaet der untersuchten Zellsuspension ab. Ein hoher Hintergrundswert an toten Zellen erschwert die Beurteilung der spezifisch-toxischen Aktivitaet von Antiseren.

Die Viabilitaet von Zellsuspensionen wurde mit der Eosinrot-Methode bestimmt.

In Tab. 2 sind die gefundenen Werte fuer 5 verschiedene Zellkulturen wiedergegeben. In Tab. 3 werden die Durchschnittswerte des Anteils toter Zellen fuer verschiedene PHA-Werte dargestellt.

TAB. 2
Daten zum Kulturablauf von 5 Zellkulturen (einschliesslich der Viabilitaetswerte am Ende der Kultur).

Spender	E.A.			G.K.			R.F.			I.T.			U.E.		
Bearbeitetes Blutvolumen [ml]	25			25			25			25			25		
Zahl der gewonnenen Lymphozyten [10**6]	13,2			14,0			35,2			38,0			11,6		
Davon tote Zellen [%]	-			12			3			3			2		
Kulturzeit[d]	4			4			4			4			4		
PHA-Konzentration [ug/ml]	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4
Suspensionsvolumen nach Kultur und Resuspension [ml]	2,5	2,5	2,5	---	0,8	0,8	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,7	0,7	0,7
Konzentration von Zellen nach Kultur [10**6/ml]	,97	1,7	1,2	---	3,9	3,3	1,2	4,6	4,3	,91	,89	,77	2,7	3,7	3,6
Davon:															
lebende[%]	88	69	71	---	72	70	46	69	71	59	64	50	90	75	74
tote [%]	12	31	29	---	28	30	54	31	29	41	36	50	10	25	26

TAB. 3
Durchschnittswerte (5 Spender) des Anteils toter Zellen [%] nach Kultur fuer verschiedene PHA-Konzentrationen (Daten aus Tab. 2).

PHA-Konzentration [ug/ml]	Spender E.A.	G.K.	R.F.	I.T.	U.E.	Durchschnitt
0	12	-	54	41	10	29,3
2	31	28	31	36	25	30,2
4	29	30	29	50	26	32,8

Tab. 3 zeigt, dass zwar eine grosse Schwankungsbreite des Anteils toter Zellen bei den einzelnen Zellkulturen vorliegt, dass aber zwischen den drei PHA-Konzentrationen kein signifikanter Unterschied besteht. Dies deutet darauf hin, dass die toxische Wirkung, die PHA bei hoher Konzentration zeigt, bei 4 ug/ml noch keinen wesentlichen Einfluss nimmt.

3.1.4 Blastenentwicklung waehrend der Zellkultur

Bei den ersten 4 Zellkulturen wurde beim Zaehlen der Zellen nur zwischen lebenden und nicht lebenden Zellen unterschieden. Bei allen weiteren Zellkulturen wurden die Zellen durch differenzierende Auszaehlung nach morphologischen Kriterien in 4 Klassen eingeteilt.

A - "Blasten": grosse (etwa doppelter Durchmesser wie die urspruenglichen, nicht-stimulierten Lymphozyten), helle, kreisrunde Zellen, z.T. mit feinen Granula.

B - "Unstimulierte Lymphozyten": kreisrunde, weniger helle Zellen, nicht vergroessert im Vergleich zu den urspruenglich eingesetzten Lymphozyten.

C - "Amorphe Zellen": Zellen, die sich weder zur Gruppe A noch zur Gruppe B zuordnen lassen, meist mit unregelmaessiger Form, unregelmaessiger Begrenzungslinie, mit Ausziehungen und z.T. Granulationen.

D - "Tote Zellen": dunkel angefaerbt durch Eosin.

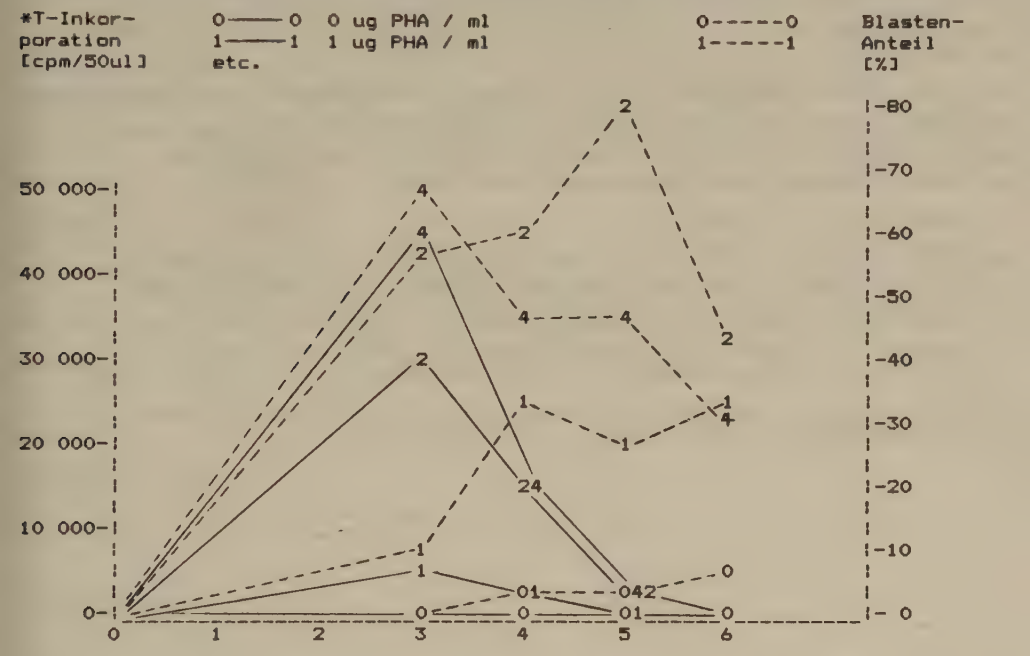
Zur Veranschaulichung sind fuer eine Zellkultur die entsprechenden Werte im zeitlichen Verlauf zusammengestellt (Tab. 4).

TAB. 4
Ergebnisse der differenzierenden Zellzaehlung fuer eine Kultur (Spender U.E.) bei verschiedenen PHA-Konzentrationen an verschiedenen Ablesetagen (Erklaerung der Zellklassen im Text).

	Ablesetag:															
	Kultur-beginn	3.Tag				4.Tag				5.Tag				6.Tag			
PHA-Konzentration [ul/ml]	-	0	1	2	4	0	1	2	4	0	1	2	4	0	1	2	4
Zellkonzentration [10**6/ml]	1,0	1,5		2,0		1,5		3,7		1,2		3,1		1,1		3,6	
			1,5		2,5		1,3		4,6		1,8		3,2		2,2		3,5
Davon[%]:																	
A Blasten	-	0	10	57	67	5	34	60	46	5	25	79	47	8	32	43	31
B Kleine Lymphozyten	98	84	69	27	12	86	43	16	16	81	43	7	17	59	30	14	8
C Amorphe Zellen	-	4	15	9	7	0	19	19	23	5	19	5	21	5	11	9	4
D Tote Zellen	2	12	6	7	14	9	4	5	15	9	11	9	15	28	28	34	57

In Abb. 3 sind die Werte fuer die Blastenentwicklung aus Tab. 4 zusammen mit Werten fuer die *T-Inkorporation fuer einen Spender graphisch dargestellt.

ABB. 3
Verlauf einer Zellkultur (Spender U.E.): 3H-Thymidininkorporation und Blastenentwicklung bei PHA-Konzentrationen von 0, 1, 2 und 4 ug/ml.



Interpretation der Abb. 3 zeigt folgende Ergebnisse:

a) Die Entwicklung des Blastenanteils liegt bei PHA-Konzentrationen von 2 und 4 ug/ml auf einem Niveau an Lymphozytenstimulation, das bei 1 ug PHA / ml nur zu 25% erreicht wird. Dies entspricht den Beobachtungen zur Lymphozytenstimulation mithilfe der *T-Inkorporationsmethode.

b) *T-Inkorporation und Blastenentwicklung sind zeitlich zueinander versetzt. Waehrend die *T-Inkorporation ihr Maximum am 3. Kulturtag erreicht, steigt der Blastenanteil erst am 4. bis 5. Kulturtag auf den hoechsten Punkt an.

3.1.5 Zusammenfassung der Untersuchungen zu den Kulturbedingungen

a) PHA-Konzentration

Die Ergebnisse der Blastenauszaehlung und der *T-Inkorporationsmessung legen nahe, dass 1 ug PHA / ml noch keine adaequate Lymphozytenstimulation bewirkt, waehrend bei PHA-Konzentrationen von 2 und 4 ug/ml ein Plateau an Stimulationskapazitaet erreicht wird. Andererseits zeigt der Vergleich der Toxizitaet verschiedener PHA-Konzentrationen, dass die hoechste verwendete Konzentration, 4 ug/ml, noch nicht im toxischen Bereich des PHA liegt.

Fuer alle weiteren Kulturen wurde festgelegt, die Zellsuspension eines einzelnen Spenders bei Konzentrationen von 0, 2 und 4 ug PHA / ml zu inkubieren. Dabei dienen die bei 0 ug/ml kultivierten Zellen als Kontrolle, waehrend die bei 2 und 4 ug/ml kultivierten Zellen jeweils parallel auf ihre Antigenexpression untersucht werden sollen.

b) Kulturdauer

Fuer die Bestimmung der optimalen Kulturdauer ist die alleinige Messung der *T-Inkorporation kein ausreichender Parameter wegen der zeitlichen Versetzung zur morphologisch definierten Blastenentwicklung. Der mikroskopisch bestimmte Blastenanteil erreicht zwischen 4. und 5. Tag ein Maximum. Bei laengerer Kulturzeit fuehrt der steigende Anteil toter Zellen zu einer immer staerkeren Stoergroesse.

Fuer alle weiteren Kulturen wurde festgelegt, die Zellen am 5. Kulturtag zu ernten und im Lymphozytotoxizitaetstest zu testen.

3.1.6 Zusammenfassung der in der Literatur angegebenen Kulturbedingungen

Zum Vergleich soll hier eine Zusammenfassung der Kulturbedingungen folgen, die in der Literatur zur Lymphozytenstimulation angegeben werden (Tab. 5).

TAB. 5
Zusammenstellung von Kulturbedingungen zur Lymphozytenstimulation (Abkuerzungen: "-" = keine Angabe, ConA = Concavalin A, PWM = Pokeweed Mitogen, NIH = Standardmethode des National Institute of Health - der in 2.9 beschriebene Lymphozytotoxizitaetstest).

Autor	Gazit et al	Christiansen et al	DeWolf et al	Ko et al
Jahr	1980b	1981	1979	1979
Thema der Arbeit	T-Blasten-spezifische Antigene	T-Blasten-spezifische Antigene	DR-Expression auf T-Blasten	DR-Expression auf T-Blasten
Kuluransatz:				
Zellgruppe	Periphere Blutlymphozyten	T-Lymphozyten	T-Lymphozyten	T-Lymphozyten
Medium	RPMI	RPMI	RPMI+Hepes	RPMI+Hepes
Zelldichte [10**6/ml]	1,0	0,5	1,0	1,0
Mitogen:				
Art Konzentration Marke	PHA (HA-17) 3 ug/ml Wellcome ConA 1,2 ug/ml Sigma Chemical	PHA (HA-16) 2 ug/ml Wellcome	PHA (HA-17) 3 ug/ml Wellcome ConA 2,5 ug/ml Sigma Chemical	PHA 1:100 Gibco ConA 40 ug/ml Pharmacia PWM 1:100 Grand Island
Zellernte:				
am Tag	5	6	6	7
Anreicherung lebender Zellen	-	Waschen mit RPMI; Ficoll-Gradient	-	Gradient mit Kaelber-ALbumin
Testmethode	Fluorochromasie	NIH	*Cr-Freisetzung	Immunfluoreszenz

3.1.7 Daten zum Kulturablauf der Zellkulturen

Die ersten 5, oben beschriebenen, Kulturen dienten der Etablierung von Kulturbedingungen, die dann fuer die restlichen 17 Kulturansaetze moeglichst invariant beibehalten wurden.

Zum Abschluss dieses Kapitels ueber methodologische Ergebnisse sollen die wichtigsten Daten zum Verlauf aller Kulturen, die in die vorliegende Arbeit eingehen, zusammengestellt werden (Tab. 6). Zur besseren Uebersicht sind fuer die 10 Zellkulturen, bei denen vollstaendige Daten zum Kulturablauf verfuegbar sind, am Ende der Tab. 6 die Durchschnittswerte angegeben.

TAB. 6a
Daten zum Ablauf der Zellkulturen (fuer die ersten 5 Kulturen - Spender E.A., G.K., R.F., I.T. und U.E. - sind die entsprechenden Werte bereits in Tab. 2 wiedergegeben).

Spender	W.S.			E.S.			U.S.			B.Su.		
Verwendete Blutmenge	20 ml			20 ml			20 ml			-		
Gewonnene Zellzahl [10**6/ml]	16,1			12,1			20,4			16,6		
Davon [%]:												
A Blasten	11			4			11			0		
B Kleine Lymphozyten	74			84			76			88		
C Amorphe Zellen	3			5			3			5		
D Tote Zellen	12			7			10			7		
PHA-Konzentr. [ug/ml]	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4
Eingesetzte Zellzahl [10**6]	4,8	4,8	4,8	3,7	3,7	3,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7
Zellzahl bei Kulturende [10**6]	2,6	2,6	3,3	2,1	5,8	3,0	2,1	2,1	2,5	4,2	5,2	8,7
Ausbeute [%]	54	54	69	57	156	81	45	45	53	89	111	185
Davon [%]:												
A Blasten	28	27	30	11	33	41	5	17	20	14	17	30
B Kleine Lymphozyten	47	39	32	65	43	30	73	61	54	60	38	24
C Amorphe Zellen	0	3	2	1	4	1	7	1	3	5	6	8
D Tote Zellen	25	31	36	23	20	28	15	21	23	21	39	38

TAB. 6b
Daten zum Ablauf der Zellkulturen

Spender	C.Su			Mu.F.			U.F.			E.A		
Verwendete Blutmenge	-			60 ml			60 ml			-		
Gewonnene Zellzahl [10**6/ml]	21,1			55,2			43,8			11,4		
Davon [%]:												
A Blasten	2			5			0			-		
B Kleine Lymphozyten	91			70			92			97		
C Amorphe Zellen	5			17			4			-		
D Tote Zellen	2			8			4			3		
PHA-Konzentr. [ug/ml]	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4
Eingesetzte Zellzahl [10**6]	5,0	5,0	5,0	7,9	23,7	23,7	6,3	18,8	18,8	3,8	3,8	3,8
Zellzahl bei Kulturende [10**6]	2,3	5,1	7,9	4,0	28,6	37,8	4,3	16,4	40,0	3,3	10,8	8,5
Ausbeute [%]	46	102	158	51	121	159	68	87	213	87	284	224
Davon [%]:												
A Blasten	4	19	18	4	49	43	8	19	28	10	49	64
B Kleine Lymphozyten	79	55	23	68	38	27	84	65	46	57	21	18
C Amorphe Zellen	4	12	9	4	7	13	0	0	10	0	18	5
D Tote Zellen	13	14	49	14	6	17	8	16	16	33	12	13

TAB. 6c
Daten zum Ablauf der Zellkulturen

Spender	G.K.			Ma.L.			Co.L.			R.F.		
Verwendete Blutmenge	27 ml			30 ml			30 ml			45 ml		
Gewonnene Zellzahl [10**6/ml]	26,7			53,4			52,2			56,0		
Davon [%]:												
A Blasten	9			3			1			-		
B Kleine Lymphozyten	81			87			82			65		
C Amorphe Zellen	9			2			1			-		
D Tote Zellen	1			8			16			35		
PHA-Konzentr. [ug/ml]	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4
Eingesetzte Zellzahl [10**6]	8,9	8,9	8,9	17,8	17,8	17,8	17,4	17,4	17,4	18,9	18,9	18,9
Zellzahl bei Kulturende [10**6]	6,1	18,1	25,1	12,0	9,2	11,2	12,8	22,6	28,3	5,4	3,8	4,2
Ausbeute [%]	69	203	282	67	52	63	74	130	163			
Davon [%]:												
A Blasten	11	40	34	2	11	11	3	14	18	-	-	-
B Kleine Lymphozyten	69	29	50	73	59	35	55	41	40	-	-	-
C Amorphe Zellen	8	23	8	5	11	2	8	9	6	-	-	-
D Tote Zellen	12	8	8	20	19	52	34	36	44	100	100	100

TAB. 6d
Daten zum Ablauf der Zellkulturen

Spender	I.T.			R.W.			H.F.			H.L.		
Verwendete Blutmenge	42 ml			-			-			-		
Gewonnene Zellzahl [10**6/ml]	36,8			10,0			12,0			11,7		
Davon [%]:												
A Blasten	-			-			-			-		
B Kleine Lymphozyten	64			-			-			-		
C Amorphe Zellen	-			-			-			-		
D Tote Zellen	36			-			-			-		
PHA-Konzentr. [ug/ml]	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4
Eingesetzte Zellzahl [10**6]	12,3	12,3	12,3	3,3	3,3	3,3	4,0	4,0	4,0	3,9	3,9	3,9
Zellzahl bei Kulturende [10**6]	5,0	3,3	2,6	2,5	3,5	1,7	5,8	2,2	3,1	1,7	1,4	1,3
Ausbeute [%]	41	27	21	81	106	52	145	55	87	44	36	33
Davon [%]:												
A Blasten	-			-			-			-		
B Kleine Lymphozyten	-			-			-			-		
C Amorphe Zellen	-			-			-			-		
D Tote Zellen	100			-			-			-		

TAB. 6e
Daten zum Ablauf der Zellkulturen

Spender	W.L.			R.F.			I.T.			R.L.		
Verwendete Blutmenge	-			30 ml			25 ml			-		
Gewonnene Zellzahl [10**6/ml]	8,3			25,5			34,5			30,0		
Davon [%]:												
A Blasten	-			-			-			-		
B Kleine Lymphozyten	-			85			87			-		
C Amorphe Zellen	-			-			-			-		
D Tote Zellen	-			15			13			-		
PHA-Konzentr. [ug/ml]	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4
Eingesetzte Zellzahl [10**6]	2,7	2,7	2,7	8,5	8,5	8,5	11,5	11,5	11,5	6,0	12,0	12,0
Zellzahl bei Kulturende [10**6]	0,8	2,0	1,3	10,9	18,2	15,4	14,8	16,2	15,0	3,3	27,0	25,2
Ausbeute [%]	30	74	48	128	214	181	129	141	130	55	225	210
Davon [%]:												
A Blasten	-			-			-			-		
B Kleine Lymphozyten	-			85	94	82	80	87	65	39	61	58
C Amorphe Zellen	-			-			-			-		
D Tote Zellen	-			15	6	28	20	13	35	61	39	42

TAB. 6f
Daten zum Ablauf der Zellkulturen

Spender	M.L.			Durchschnittswerte fuer 10 Spender								
Verwendete Blutmenge	-			(W.S., E.S., U.S., B.Su., C.Su., Mu.F., U.F., B.K., Ma.L., Co.L.)								
Gewonnene Zellzahl [10**6/ml]	30,0			-								
Davon [%]:												
A Blasten	-			4,6								
B Kleine Lymphozyten	-			82,5								
C Amorphe Zellen	-			5,4								
D Tote Zellen	-			7,5								
PHA-Konzentr. [ug/ml]	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4
Eingesetzte Zellzahl [10**6]	6,0	12,0	12,0	-								
Zellzahl bei Kulturende [10**6]	3,9	14,9	12,4	-								
Ausbeute[%]	65	124	103	62	106	143						
Davon [%]:												
A Blasten	-			9,0	24,6	26,5						
B Kleine Lymphozyten	28	55	63	67,3	46,8	36,2						
C Amorphe Zellen	-			5,2	7,6	6,2						
D Tote Zellen	72	45	37	18,5	21,0	31,1						

Die Durchschnittswerte fuer 10 Spender (Tab. 6f) sind in Abb. 4 graphisch wiedergegeben.

ABB. 4
Verteilung auf verschiedene Zelltypen vor und nach Kultur
bei verschiedenen PHA-Konzentrationen

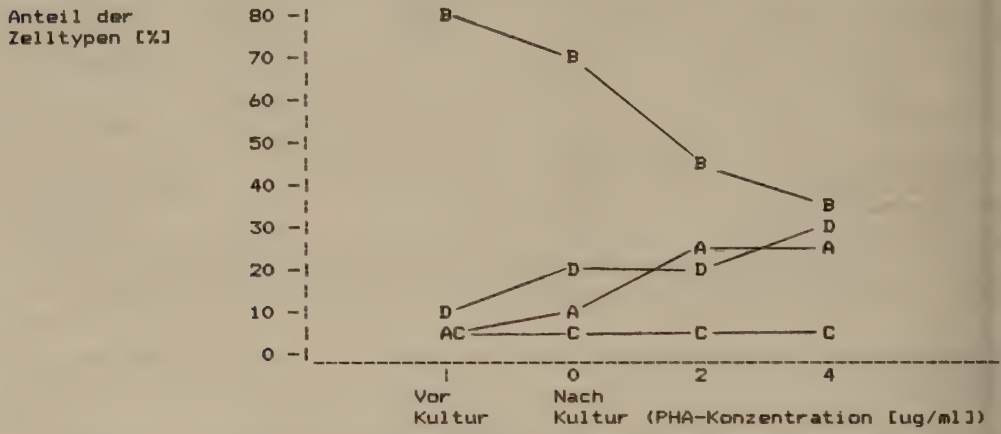


Abb. 4 zeigt Durchschnittswerte, die gut mit den, bei den 5 Vorexperimenten gefundenen Ergebnissen uebereinstimmen:

a) Der Blastenanteil (A), bei der unstimulierten Zellsuspension 4,6 %, erreic fuer PHA 2 und 4 ug/ml ein Plateau bei 25 % . Fuer PHA 1 ug/ml wird dieses Niveau nicht erreicht.

b) Der durchschnittliche Anteil amorpher Zellen (C) liegt bei Kulturbeginn und nach Kultur fuer alle PHA-Konzentrationen zwischen 5 % und 8 % . Dies spricht fuer eine methodisch (Beurteilung in der Zaehlkammer) bedingte Groesse, die durch ihre Konstanz keinen Einfluss auf den Anteil der anderen Zelltypen nimmt.

c) Der Anteil toter Zellen (D) steigt mit wachsender PHA-Konzentration. Ein moeglicher Faktor ist die toxische Wirkung des PHA. Gleichzeitig kann die starke Zellproliferation (hohe Zellausbeute bei PHA 4 ug/ml !) mit Verbrauch an Naehrstoffen zu einem vermehrten Absterben von Zellen fuehren.

3.1.8 Anreicherung von lebenden Lymphozyten

Das groesste methodische Problem bei den vorliegenden Untersuchungen war der hohe Hintergrundswert an toten Zellen zum Abschluss der Zellkultur. Dadurch waren manche Kulturansaetze fuer den Lymphozytotoxizitaetstest nicht meht verwendbar und brachten keine Ergebnisse.

Das Problem laesst sich beherrschen, indem am Ende der Zellkultur ein zusaetzlicher Schritt zur Anreicherung lebender Lymphozyten eingefuegt wird. Die Methode hierzu ist im Abschnitt 2.7 beschrieben .In der vorliegenden Arbeit stand die Methode anfangs noch nicht zur Verfuegung. Sie wurde erst bei den letzten Kulturansaetzen mitverwendet, wenn ein hoher Anteil lysierter Zellen dies erforderlich machte.

Die Methode erweist sich als hilfreich fuer jede experimentelle Arbeit mit Lymphozytenkulturen, die auf einen hohen Anteil lebender Zellen angewiesen ist. Deshalb sollen neben der Beschreibung der Methode selbst, hier auch die Ergebnisse eines Anwendungsbeispieles wiedergegeben werden (Tab. 7).

TAB. 7
Anwendungsbeispiel fuer die Ficoll-Separation zur Anreicherung lebender Lymphozyten (Methode siehe 2.7).

Spender	R.F.			I.T.		
PHA-Konzentration [ug/ml]	0	2	4	0	2	4
vor Gradient:						
Zellzahl [10**6], davon[%]	2,4	1,3	1,9	2,3	2,1	3,1
lebende Zellen	71	58	76	50	65	59
tote Zellen	29	42	24	50	35	42
nach Gradient:						
Zellzahl [10**6], davon[%]	0,31	0,61	0,64	0,36	0,85	0,74
lebende Zellen	100	80	81	83	95	88
tote Zellen	0	20	19	17	5	12
Zellausbeute [%] (bezogen auf lebende Zellen)	18	64	36	26	59	36

Es zeigt sich eine zufriedenstellende Anreicherung der lebenden Zellen auf einen Anteil von 80 bis 100 %. Dies wird durch eine geringe Zellausbeute mit hohem Verlust an Zellen erkauft. Wegen des geringen Zellbedarfs beim Mikrolymphozytotoxizitaetstest (2000 Zellen pro Reaktion) stellt die geringe Zellausbeute von etwa einem Drittel jedoch keinen Hinderungsgrund dar, waehrend die Erhoehung der Viabilitaet die Aussagekraft des Tests deutlich verbessert.

3.2 Untersuchung von unausgewaehlten Schwangerenseren

3.2.1 Vortestung der Seren

Zur Vorauswahl von Seren wurden in der ersten Reihe von 4 Experimenten insgesamt 298 unausgewaehlte Schwangerenseren untersucht. In diesen Experimenten wurden Lymphozyten je eines Spenders stimuliert und mit den 298 Seren getestet. Nach den Ergebnissen dieses dieses Vorversuchs wurden solche Seren fuer die weitere Untersuchung ausgewaehlt, welche mit aktivierten Lymphozyten positiv reagiert hatten.

Auswahlkriterium fuer ein Serum war, dass es bei mindestens einem der 4 Spender blastenpositiv reagierte. Blastenpositive Reaktion wurde dabei definiert als

- negative Reaktion mit PHA-0-Lymphozyten (LZT=0);
- positive Reaktion bei PHA-2- und PHA-4-Lymphozyten (LZT zusammen ≥ 3).

Beispiel: Eine Reaktionsgruppe fuer PHA-0,2,4-Lymphozyten von LZT=0,1,2 zaehlt als blastenpositiv, die Reaktionsgruppen LZT=0,1,1 oder LZT=0,0,2 zaehlen nicht mehr als blastenpositiv.

Nach den obigen Kriterien wurden insgesamt 32 von 298 Seren zur weiteren Untersuchung ausgewaehlt. Die Reaktionen der 32 Seren in den ersten 4 Experimenten sind in Tab. 8 dargestellt.

TAB. 8
Reaktionswerte im LZT-Test von 32 ausgewahlten Seren mit 4 Spendern
Abkuerzungen: "-" = LZT 0
"/" = keine Reaktion ablesbar
"1, 2, 3 bzw. 4" = LZT 1, 2, 3 bzw. 4
"**" = kennzeichnet blastenpositive Reaktionsgruppen (Definition im Text)

Spender	E.A.	B.K.	R.F.	I.T.	Spender	E.A.	B.K.	R.F.	I.T.
Zelltyp [PHA]	024	024	024	024	Zelltyp [PHA]	024	024	024	024
Serumnr.					Serumnr.				
M 1	**-4-	--1	---	---	M21	---	---	---	**-23
M 2	**-22	-2-	/--	-2-	M22	---	---	---	**--4
M 3	**-31	---	--1	---	M23	/--	---	---	**-42
M 4	**-22	**-34	--1	--2	M24	---	---	---	**-3-
M 5	**--3	144	222	223	M25	/--	---	---	**-4-
M 6	**-23	---	--1	**-3-	M26	---	---	---	**-3-
M 7	**-3-	/2-	---	**-3-	M27	---	-2-	---	**-4-
M 8	**-3-	---	---	**-4-	M28	-/-	---	2--	**-31
M 9	---	**-22	---	---	M29	---	---	---	2--
M10	---	**-12	---	---	M30	1--	12-	-11	---
M11	---	**-3-	---	---	M31	---	-11	--/	-/-
M12	---	**-21	---	---	M32	---	-11	---	---
M13	---	--2	**-3-	---					
M14	---	---	**-3/	---					
M15	---	31-	**-3-	2-4					
M16	---	---	**-32	---					
M17	/32	---	-2-	---					
M18	--2	-1-	**-4-	---					
M19	---	---	**-13	**-34					
M20	---	2--	---	**-31					

Tab. 8 zeigt, dass unter insgesamt 1196 getesteten Reaktionsgruppen (298 Seren mit 4 Spendern) 34 blastenpositive Reaktionsgruppen gefunden wurden. Dies entspricht einer Haeufigkeit von 3 % , mit der die Lymphozyten eines Spenders bei einem unausgewaehlten Panel von Schwangerenseren blastenpositiv reagieren.

Die blastenpositiven Reaktionen verteilen sich etwa gleichmaessig auf die Spender (einmal 6, einmal 7, einmal 8 und einmal 13 blastenpositive Reaktionsgruppen pro Spender).

Die Verteilung der blastenpositiven Reaktionen auf die Seren zeigt einen isospezifischen Charakter: 22 Seren reagieren mit einem, 6 Seren reagieren mit zwei der vier Spenderzellen blastenpositiv. Gemeinsame blastenpositive Reaktionen fuer ein Serum bei zwei Spendern treten ueberzufaellig haeufig bei den Spenderpaaren E.A./G.K. und E.A./I.T. auf.

Fuer jede Spenderzelle liegen mindestens 3 Seren vor, die ausschliesslich mit dieser Spenderzelle blastenpositiv reagieren. Dies ist Hinweis fuer den polymorphen Charakter eines moeglicherweise zugrundeliegenden Antigensystems.

3.2.2 Weitere Untersuchung der Seren mit B-Zell-Kontrolle

Wie in der Einleitung beschrieben ist bekannt, dass stimulierte T-Zellen DR-Antigene exprimieren koennen, die sonst fast ausschliesslich auf B-Zellen gefunden werden. Um die Natur der blastenpositiven Reaktionen naeher zu charakterisieren muessen daher zusaetzlich zu den stimulierten Zellen eines Spenders auch frische B- und T-Zellen untersucht werden.

Die in der Voruntersuchung ausgewaehlten 32 Seren wurden auf einer Testplatte (E3) zusammengestellt. Diese Platte wurde mit Zellen von 6 Spendern getestet, wobei jeweils 5 Einzelreaktionen bestimmt wurden: Serumreaktion mit frischen T- und B-Zellen und mit kultivierten T-Zellen bei PHA-Konzentrationen von 0, 2 und 4 ug/ml. Die Ergebnisse dieser 5 Einzelreaktionen pro Serum/Zell-Paar werden zusammenfassend als Reaktionsgruppe bezeichnet.

In Tab. 9 sind die Reaktionswerte fuer Platte E3 dargestellt.

Blastenpositive Reaktionsgruppen sind wieder mit "*" gekennzeichnet. Als blastenpositive Reaktionsgruppe wird eine Serumreaktion definiert, die
a) mit frischen T-Zellen negativ reagiert (LZT=0);
b) mit PHA-2-Lymphozyten und mit PHA-4-Lymphozyten positiv reagiert, wobei wieder als positiv gilt, wenn die Reaktionsstaerke im LZT-Test fuer diese beiden Reaktionen zusammen mindestens 3 Punkte erreicht.

Der Reaktionswert fuer PHA-0-Lymphozyten geht nicht in die Definition mit ein, weil sich gezeigt hat, dass die Lymphozyten auch bei Kultur ohne PHA in eine schwache Aktivierung eintreten koennen (Naehere Analyse dazu siehe Abschnitt 3.3.2).

TAB. 9
Reaktionswerte im LZT-Test der Seren auf Platte E3 (6 Spender).
Abkuerzungen: "-" = LZT 0
"/" = keine Reaktion ablesbar
"1, 2, 3 bzw. 4" = LZT 1, 2, 3 bzw. 4
"D*" = kennzeichnet blastenpositive Reaktionsgruppen vom Typ der DR-Expression
"B*" = kennzeichnet blastenpositive Reaktionsgruppen vom Typ blastenspezifischer Antigene (Definition siehe Text)

Spender	M.L.	C.L.	E.A.	G.K.	R.F.	I.T.
Zelltyp	TB024	TB024	TB024	TB024	TB024	TB024
Serum-Nr.						
M1	----1	-----	---1-	B*--122	-2---	-----
M2	311--	-----	-2---	-3---	----2	---1-
M3	-----	-----	-----	-----	-----	-2---
M4	1231-	D*-2212	-----	--2--	D*-2434	B*--434
M5	22323	D*-1123	-----	-4211	D*-3144	B*--444
M6	-----	---1-	-----	D*-4--4	D*-42-4	D*-3--3
M7	-----	-1---	---2-	---1-	----1	-----
M8	-----	-----	-----	-----	-/---	-/--/
M9	-----	-----	-----	----1	-----	-----
M10	-1-11	----1	-----	-1--1	----1	-4---
M11	-----	-----	-----	-----	-2---	-----
M12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M13	-----	-----	-----	B*---21	----2	---2-
M14	-1---	-----	-----	-----	-----	-----
M15	-1---	-----	-----	-----	B*---13	-1-2-
M16	-----	-----	-----	-----	-3-1-	----2
M17	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M18	-----	-----	-----	-----	-1---	-----
M19	-----	-----	-----	----1	B*----4	32441
M20	123--	-31-1	-----	D*-4213	----1	-----
M21	-----	-----	-----	-----	----2	---2-
M22	B*---12	B*---12	-----	-----	B*----3	-1-2-
M23	-----	-----	-----	-----	-1--2	---1-
M24	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M25	----1	-----	-----	-----	-----	-----
M26	-----	----1	-----	-----	-----	-----
M27	-----	-----	---/-	--/--	-/---	///--
M28	----1	-----	-----	-----	-----	-----
M29	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M30	-----	-----	-----	-2---	-----	-----
M31	-----	---1-	-----	B*---22	-1---	-1---
M32	-2---	-----	-----	-----	-----	-----

Tab. 9 zeigt fuer 32 Seren bei 6 Spendern insgesamt 19 blastenpositive("*") Reaktionsgruppen.

Diese lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Wenn das blastenpositive Serum gleichzeitig mit B-Zellen desselben Spenders positiv (LZT≥1) reagiert, dann kann die blastenpositive Reaktion durch Expression von B-Zell-spezifischen DR-Antigenen erklaert werden (Typ D). Diese Reaktionsgruppen sind in Tab. 9 mit "D*" markiert. Blastenpositive Reaktionsgruppen, die sowohl mit frischen T-Zellen als auch mit frischen B-Zellen negativ reagieren, koennten auf blastenspezifischen Antigenen beruhen (Typ B). Sie sind in Tab. 9 mit "B*" markiert.

9 blastenpositive Reaktionsgruppen haben auch bei B-Zellen positive Reaktion, rechnen also zur Reaktionsgruppe vom Typ D, der durch DR-Expression auf aktivierten Lymphozyten erklaert werden kann. 10 Reaktionsgruppen reagieren blastenpositiv, aber B-Zell-negativ, also entsprechend Typ B.

Bezogen auf die einzelnen Seren zeigt sich folgendes Reaktionsmuster: 7 Seren reagieren mit einem, 1 Serum (M22) reagiert mit 3 Zellspendern blastenpositiv und B-Zell-negativ.

3.2.3 Untersuchung mit absorbierten Seren

Es ist bekannt, dass T-Zellen unter Stimulation ihre HLA-Antigene vom Typ A, B und C verstaerkt exprimieren (McCune et al 1975). Dies koennte die blastenpositive Reaktion von manchen Seren erklaeren, die nur schwache lytische Aktivitaet gegen HLA-A,B und C-Antigene enthalten. Diese Seren wuerden mit frischen T- und B-Zellen negativ reagieren, koennten aber stimulierte T-Zellen mit ihrer hoeheren Antigendichte lysieren.

Um diesen Mechanismus naeher zu untersuchen wurden alle Seren der Testplatte E3 mit Thrombozyten absorbiert (Methode siehe Abschnitt 2.3). Dadurch werde Antikoerper, welche HLA-Antigene vom Typ A, B und C erkennen, dem Serum entzogen. Mit den absorbierten Seren wurde eine neue Testplatte (E4) zusammengestellt und parallel zur E3 Platte auf den stimulierten Spenderzellen getestet. Die Ergebnisse sind in Tab. 10 dargestellt.

TAB. 10
Reaktionswerte im LZT-Test der Seren auf Platte E4 (6 Spender); Abkuerzungen siehe Tab. 9.

Spender	M.L.	C.L.	E.A.	G.K.	R.F.	I.T.
Zelltyp	TB024	TB024	TB024	TB024	TB024	TB024
Serumnr. (alle absorbiert)						
M1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M3	-----	-----	-----	-----	-----	-3---
M4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M5	-----	-----	-----	-----	-2---	-----
M6	-1---	-----	4---1	-42--	-----	-----
M7	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M8	-----	-----	-----	-/---	-----	-----
M9	-----	-----	-----	----2	-----	B*----4
M10	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M11	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M12	-----	----1	-----	-----	-----	-----
M13	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M14	-----	-----	-----	-----	-----	-/---
M15	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M16	-3---	-----	-----	-----	-1---	-----
M17	-----	-----	-----	-----	-----	-1---
M18	-----	-----	-----	-----	-----	-1---
M19	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M20	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M21	-----	-----	-----	-----	-----	-1---
M22	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M23	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M24	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M25	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M26	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M27	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M28	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M29	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M30	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M31	----1	-----	-----	-----	-----	-1-2-
M32	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Es zeigt sich, dass fast alle blastenpositiven Reaktionen bei Absorbtion der Seren mit Thrombozyten verschwinden. Fuer 32 absorbierte Seren bei 6 Spendern finden sich nur eine blastenpositive, B-Zell-negative Reaktionsgruppen.

Fuer eine naehere Analyse dieser Ergebnisse siehe Abschnitt 4.2 der Diskussion.

3.3. Untersuchung von Schwangerenseren mit DR-Antikoerpern

3.3.1 Reaktionswerte der Seren

Als weitere Gruppe von Seren wurden bereits absorbierte Schwangerenseren mit DR-Aktivitaet untersucht. Darunter waren Seren mit bekannter DR-Spezifitaet, welche als Typisierungsseren verwendet werden, Seren mit fraglicher DR-Spezifitaet und Seren, die multispezifisch oder mit nicht eindeutig festgelegter Spezifitaet mit B-Zellen positiv reagierten. Mit 54 dieser Seren wurde eine Testplatte zusammengestellt (Plattennummer: E6).

Auf Platte E6 wurden Zellen von insgesamt 10 Spendern, darunter 6 Angehoerige einer Familie getestet. Pro Spender wurden jeweils wieder frische T- und B-Zellen und bei PHA-Konzentrationen von 0, 2 und 4 ug/ml kultivierte Lymphozyten getestet. Die Ergebnisse sind in Tab. 11 dargestellt.

Als blastenspezifisch, d. h. T- und B-Zell-negativ und blastenpositiv, gilt eine Reaktionsgruppe, die

a) bei T-Zellen sicher negativ reagiert (LZT=0)
b) bei B-Zellen sicher negativ reagiert (LZT=0)
c) bei Blasten deutlich positiv reagiert
(fuer PHA-2- und PHA-4-Lymphozyten zusammen LZT $\geq$ 3).

TAB. 11
Reaktionswerte im LZT-Test der Seren auf Platte E6 (mit 10 Spendern).
Abkuerzungen: "-" = LZT 0
"/" = keine Reaktion ablesbar
1, 2, 3 bzw. 4" = LZT 1, 2, 3 bzw. 4
"**" = kennzeichnet blastenspezifische Reaktionsgruppen (Definition im Text)

Spender	E.A.	G.K.	R.F.	I.T.	H.L. (Va)	M.L. (Mu)	W.L. (K1)	C.L. (K2)	M.L. (K3)	R.L. (K4)
Zelltyp	TB024	TB024	TB024	TB024	TB024	TB024	TB024	TB024	TB024	TB024
Serum Nr.										
N 1	-3---	-----	-4---	-----	-2---	-2---	-4122	-----	----/	-24--
N 2	-3---	-----	-2/--	-----	-2---	-3---	-4---	-----	-----	-23--
N 3	-2---	-----	---/-	-----	-1---	-1---	-----	---1-	-----	-3---
N 4	-----	-----	-1---	-----	-----	-----	----2	-----	----1	-2---
N 5	-----	-----	-2---	-----	-1---	-3---	-----	-----	-----	-3---
N 6	1----	---/-	-/---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-2---
N 7	-4122	-----	-2---	-4-3-	33432	-----	---2-**	-21-2	---32	-1244
N 8	-----	-/---	-----	---/-	**--133	-----	---/-	-----	----/	-----
N 9	-----	-----**	----4	-4-3-	-/4-/	-----	-----	-----	-----**	----44
N10	-----	-----**	----4	-4-4-	----1	---1-	-----	-----	-----**	----3

TAB. 11 Forts.
Reaktionswerte im LZT-Test der Seren auf Platte E6 (mit 10 Spendern).

Spender	E.A.	G.K.	R.F.	I.T.	H.L. (Va)	M.L. (Mu)	W.L. (K1)	C.L. (K2)	M.L. (K3)	R.L. (K4)
Zelltyp	TB024	TB024	TB024	TB024	TB024	TB024	TB024	TB024	TB024	TB024
Serum Nr.										
N11	-2-21	-----	-/---	-2---	-----	-----	-----	-----	----1	-----
N12	-2---	-----	-----	-----	-----	---1-	----1	-2---	-----	-----
N13	**---32	----1	-1--4	23-43**--334		-4344	----2	-3144	-3-44**---34	
N14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----2	-----	-----	-----
N15	--1-1	-2---	-2---	-/---	--3-1	-2---	----2	-2---	-1---	-----
N16	-----	-----	--/--	23-4-	2-322**----3**		----3	-----	-----	-2-23
N17	-----	-/1--	-----	-----	-----	-1---	--3--	---/-	-----	-----
N18	-----	-/---	--/--	-----	**---22	-----	-4-/-	-1---	-2---	-----
N19	-----	----/	-----	-----	-4---	-----	----1	-----	---1-	-----
N20	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N21	-2/1-	-----	-2---	-----	-----	----2	----2	-1---	-----	-----
N22	-----	-----	-----	-4---	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N23	-----	-----	--/--	-----	-----	-----	-1--2	-----	-----	-----
N24	--/--	-----	----2	-----	-----	-2---	-----	-----	-21--	-----
N25	-----	-----	-----	-3-1-	-----	-2--3	-2---	-3---	-1---	-----
N26	-----	-----	-1---	-4---**---12		-3--2	-4-21	-4-22	-2212	-----
N27	/2---	-/---	-----	--22-	--1-1	-3--2	-4-3-	-4-/1	-3324	-1-43
N28	-----	-/---	-----	-----	/----	-----	--1--	-----	-----	-----
N29	-2---	-32--	-----	----/	-4--1	-2---	-----	-3---	-1--/	-----
N30	-----	-----	-----	-2---	---1-	-----	-----	-----	-----	-----
N31	----1	-----	-----	--1--	-----	-----	--2--	-----	-----	-----
N32	-----	-2---	-----	-----	--2--	-----	---1-	-2---	----/	-1---
N33	-----	-1---	-1///	--///	-----	----1	-----	-2---	-----	--//-
N34	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N35	-1---	-----	-----	-----	-----	-----	----1	-----	-----	-----
N36	-2---	-----	-----	-4---	-----	----**---22		-----	-----	--1--
N37	-1---	-/---	-----	-2---	----1	-----	----2	-----	----/	-----
N38	-----	-/---	-----	-----	-----	----2	-----	----2**---22		-----
N39	-----	-1-21	-----	-4---	---21	-2-11	-----	-1---	-1---	-----
N40	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----/	-----
N41	-4-1-	-----	-3---	-----	---1-	-3--2**---22		-----	-----	-44--
N42	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N43	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--2--	-----	-----	-----
N44	-----	-----	--///	--///	-----	-----	---//	-----	---//	--///
N45	-/---	-----	-----	-----	-----	-----	----2	----1	--/-/	-1---
N46	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----2	-----	----1	-----
N47	-----	-/---	---/-	-----	---2-	----**---12		-----	-----	-----
N48	-----	-/---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N49	-----	-----	--/--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N50	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N51	-----	-----	-----	-----	---/-	-----	-----	-----	-----	-----
N52	-2---	-----	-----	-----	-----	-----	----/	-----	-----	-----
N53	-----	-----	/----	-----	-----	-----	----2	----1	--12-	--2--
N54	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----1	-----	-----

Fuer 54 Seren bei 10 Spendern finden sich insgesamt 17 blastenpositive, B-Zell-negative Reaktionsgruppen. Ein Serum reagiert bei 3 Spendern in diesem Sinne, 3 Seren reagieren bei je 2 Spendern in diesem Sinne.

Auf einer anderen Platte (Plattennummer CB62) wurden 48 weitere absorbierte Seren mit fraglicher DR-Reaktivitaet getestet.
Die Ergebnisse sind in Tab. 12 dargestellt.

TAB. 12
Reaktionswerte im LZT-Test der Seren auf Platte CB62 (4 Spender)
Abkuerzungen: siehe Tab. 11.

Spender	H.L. (Va)	W.L. (K1)	M.L. (K3)	R.L. (K4)	Spender	H.L. (Va)	W.L. (K1)	M.L. (K3)	R.L. (K4)
Zelltyp	TB024	TB024	TB024	TB024	Zelltyp	TB024	TB024	TB024	TB024
Serum Nr.					Serum-Nr.				
P 1	-----	-----	-----	-----	P 26	-----	-----	-----	-----
P 2	-----	-----	-----	-----	P 27	-----	-----	-----	-----
P 3	---/-	-2--/	-----	-----	P 28	**---3-	-----	-----	-----
P 4	-----	--2--	-1---	-----	P 29	-----	-----	-----	-----
P 5	-----	-----	-----	-----	P 30	-----	-----	-----	---1-
P 6	-----	----/	-----	-----	P 31	-----	----1	-----	-----
P 7	-----**---22		-132-	-2-23	P 32	-----	-----	-----	-----
P 8	-----	/----**--/33		-----	P 33	----/	--/--	-----	-----
P 9	--2--	--3--	-----	-1---	P 34	-----	-----	-----	-----
P10	---2-	-----	-----	-----	P 35	-----	-----	-----	-----
P11	-----	-----	-----	-----	P 36	---1-	---2-	-----	-----
P12	-----	--/12	----/	-----	P 37	-----	--1-2	-----	-----
P13	-----	-----	-----	-----	P 38	-----	---1-	----1	-----
P14	---1-	-----	-----	-----	P 39	-----	----1	-----	-----
P15	-3-21	-----	-----	-----	P 40	-----	--1--	-----	-----
P16	-----	-----	-3---	-----	P 41	**---3-	-----	-----	-----
P17	14-22	-3-12	-----	-----	P 42	-----	-1---	-----	-----
P18	--1--	-----	-----	-44-1	P 43	-----	-----	-----	-----
P19	-----	---1-	-----	-----	P 44	-1-1-	----2	-----	-----
P20	---2-**--121		-----	-----	P 45	----1	----1	-33--	-33--
P21	-----	-----	-----	-----	P 46	-----	-----	--/--	-----
P22	---2-	-----	-----	-----	P 47	-----	-----	-----	-----
P23	-----	----1	-----	-----	P 48	-----	-----	-----	-----
P24	-----	-----	-----	-----					
P25	----1	-----	-----	-----					

Bei 48 absorbierten Seren, getestet mit 4 Spendern einer Familie, finden sich 5 blastenpositive, B-Zell-negative Reaktionsgruppen.

3.3.2 Allgemeine Reaktivitaet der verschiedenen Zelltypen

Um die Variablen des Kultursystems zu erfassen, wird zuerst die allgemeine Reaktivitaet der verschiedenen Zelltypen untersucht. Dies gibt einen Hinweis auf den Effekt der einzelnen PHA-Konzentrationen auf das Reaktionsverhalten der Blasten im Vergleich zu den T- und B-Zellen.
Als Mass fuer die Reaktivitaet der verschiedenen Zelltypen (T- und B-Zellen, PHA-0-Lymphozyten, PHA-2- und PHA-4-Blasten) dient die prozentuale Haeufigkeit positiver Reaktionen (LZT $\geq$ 2) bei einer groesseren Zahl von Serumreaktionen mit Zellproben verschiedener Spender.

In Tab. 13 sind die entsprechenden Daten fuer Platte E6 zusammengestellt (Daten entnommen aus Tab. 11).

TAB.7
Reaktivitaet (Haeufigkeit positiver Reaktionen) der verschiedenen Zelltypen mit Seren der Platte E6.
Abkuerzungen: R = Zahl der Serumreaktionen auf Platte E6
N = Zahl der nicht ablesbaren Serumreaktionen ("/" in Tab. 11)
P = Zahl der positiven Reaktionen (LZT$\geq$2)

		T-Zellen		B-Zellen		PHA-0-Blasten		PHA-2-Blasten		PHA-4-Blasten	
Spender	R	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P
E.A.	54	1	0	1	12	2	0	0	3	0	2
G.K.	54	0	0	9	3	0	1	1	2	1	0
R.F.	54	1	0	2	7	7	0	4	0	2	4
I.T.	54	0	2	1	13	2	1	2	6	3	2
H.L.	54	1	2	1	5	0	6	0	7	0	6
M.L.	54	0	0	0	12	0	1	0	1	0	8
W.L.	54	0	0	0	5	0	3	3	5	2	15
C.L.	54	0	0	0	10	0	0	2	2	0	4
M.L.	54	0	0	0	5	1	2	1	4	9	5
R.L.	54	0	0	0	8	2	5	2	5	1	6
Summe	540	3	4	14	80	13	19	15	35	18	52
Summe der abgelesenen Reaktionen (540-N)		537		526		527		525		522	
Reaktivitaet der Zelltypen		0,7%		15,2%		3,6%		6,7%		9,9%	

Fuer frische T-Zellen zeigt sich eine Reaktivitaet von unter einem Prozent, wie fuer absorbierte Seren zu erwarten. Dass fuer einzelne Seren auch nach Absorption noch eine Reaktivitaet gegen T-Zellen erhalten bleibt, entspricht der Erfahrung. Dem Absorptionsvorgang liegt immer ein Gleichgewicht von gebundenen und ungebundenen Antikoerpern zugrunde, so dass nie 100% der Antikoerper entfernt werden koennen.

Die kultivierten Zellen reagieren bei aufsteigender PHA-Konzentration zunehmend stark, wobei die Reaktivitaet von PHA-4-Blasten mit 9,9% noch unter der von frischen B-Zellen mit 15,2 % liegt.

Der unterschiedlichen Reaktivitaet von PHA-2- und PHA-4-Blasten koennen zwei Mechanismen zugrunde liegen. Einerseits kann die hoehere PHA-Konzentration zu einer verstaerkten Expression von Antigenen fuehren. Andererseits kann durch toxische PHA-Aktivitaet die Stabilitaet der Lymphozyten herabgesetzt und damit die Empfindlichkeit des Testsystems gegenueber schwachen Antikoerpern erhoeht werden.

3.3.3 Vergleich der Reaktionen von PHA-2- und PHA-4-Blasten

Genauer untersuchen laesst sich die Reaktivitaet der verschiedenen Zelltypen durch Betrachtung von Reaktionsgruppen, d.h. in welcher Weise sich fuer jeweils ein Serum positive und negative Reaktionen auf die Zelltypen des gleichen Spenders verteilen. Reagiert z.B. ein Serum negativ mit T-Zellen und PHA-0-Lymphozyten, und positiv mit B-Zellen, PHA-2- und PHA-4-Blasten eines Spenders, so hat es bezueglich dieses Spenders die Reaktionsgruppe (TB024) "-+-++". Tab. 14 gibt in dieser Form die Daten der Serumreaktionen von Platte E6 und Platte CB62 wieder.

TAB. 14
Haeufigkeit der Reaktionsgruppen fuer Seren der Platten E6 (10 Spender) und CB62 (4 Spender). Daten aus Tab. 11 und Tab. 12. Als positiv "+" gelten Reaktionen mit LZT $\geqslant$ 2.
Abkuerzungen: R = Zahl der Serumreaktionen auf der Testplatte
N = Zahl der nicht ablesbaren Reaktionen ("/")
S = Summe der ablesbaren Reaktionen, aufgeschluesselt in den Spalten 1 bis 16.

Spaltennummer:				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Reaktionswert:																			
T-Zelle			+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B-Zelle				-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PHA-0-Blast				-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
PHA-2-Blast				-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
PHA-4-Blast				-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	R	N	S																
PLATTE E6 Spender:																			
E.A.	54	4	50	2	39	0	0	1	0	0	0	0	8	0	1	1	0	0	0	0
G.K.	54	11	43	0	39	0	1	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0
R.F.	54	12	42	0	32	4	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0
I.T.	54	5	49	2	35	0	0	0	0	0	1	0	8	0	3	0	0	0	0	0
H.L. (Va)	54	3	51	2	37	1	2	2	2	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0
M.L. (Mu)	54	0	54	0	39	3	0	0	0	0	0	0	7	4	0	0	0	0	0	1
W.L. (K1)	54	4	50	0	28	12	1	2	3	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0
C.L. (K2)	54	2	52	0	42	1	0	0	0	0	0	0	6	1	0	2	0	0	0	0
M.L. (K3)	54	8	46	0	38	0	1	2	0	0	0	0	2	0	0	1	0	1	0	1
R.L. (K4)	54	2	52	0	38	1	0	3	1	0	0	1	4	0	0	1	3	0	0	0
PLATTE CB62 Spender:																			
H.L. (Va)	48	2	46	0	39	0	4	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
W.L. (K1)	48	4	44	0	36	2	2	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
M.L. (K3)	48	3	45	0	42	0	0	1	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
R.L. (K4)	48	0	48	0	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
Summe	732	60	672	4	529	24	11	12	9	0	1	2	49	7	8	8	5	1	0	2
Spaltennummer				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

Zum Vergleich der Reaktionen von PHA-2- und PHA-4-Blasten lassen sich die Haeufigkeiten aus den Spalten in Tab. 14 in einer Vierfeldertafel addieren (Tab. 15).

TAB. 15
Vergleich der Reaktionen von PHA-2-Blasten und PHA-4-Blasten
(Haeufigkeit des Auftretens von Reaktionsgruppen mit bestimmter Reaktionskombination)

Haeufigkeitstabelle:

Reaktion der PHA-2-Blasten	+	+	-	-
Reaktion der PHA-4-Blasten	+	-	+	-
Dazu zaehlen aus Tab. 14 die Werte der Spalten:	1	2	3	4
	5	6	7	8
	9	10	11	12
	13	14	15	16
Summe der Haeufigkeiten:	24	20	32	592

Vierfeldertafel:

		Reaktion der PHA-4-Blasten +	Reaktion der PHA-4-Blasten -	
Reaktion der PHA-2-Blasten	+	24	20	44
	-	32	592	624
Summe		56	612	668

chi**2 (mit Yates-Korrektur) = 136,2
p < 0,0001

Es zeigt sich, dass eine signifikante Korrelation zwischen der Reaktion der PHA-2- und PHA-4-Blasten besteht.
Neben den Seren, wo beide Zelltypen positive Reaktionen zeigen, treten auch Reaktionsgruppen auf, bei denen nur PHA-2-Blasten oder nur PHA-4-Blasten positiv reagieren. Dies kann zum Teil methodisch bedingt sein, durch falsch positive bzw. falsch negative Reaktionen im LZT-Test. Biologisch koennte ein Unterschied in der Kinetik der Antigenexpression bei verschiedenen PHA-Konzentrationen zugrunde liegen. Auch eine Stimulation verschiedener T-Zell-Subpopulationen bei unterschiedlichen PHA-Konzentrationen ist denkbar.

Bei anderen Autoren, die blastenspezifische Antigene auf PHA-stimulierten Lymphozyten beschreiben, wurde eine Dosisabhaengigkeit der Blastenentwicklung nicht untersucht. Deshalb konnte dort keine Aussage ueber das Vorkommen von Reaktionsunterschieden bei verschieden stark stimulierten Lymphozyten gemacht werden.

Bei der Auswertung der vorliegenden Daten wird der unterschiedlichen Reaktion von PHA-2- und PHA-4-Blasten Rechnung getragen, indem beide Werte, die Reaktion von PHA-2- und von PHA-4-Blasten, in das Kriterium "blastenpositiv" miteinbezogen werden. Als blastenpositiv gilt eine Reaktionsgruppe nur, wenn sie entweder mit einem Blastentyp stark positiv (LZT $\geq$ 3) oder mit beiden Blastentypen positiv (LZT zusammen $\geq$ 3) reagiert.

3.3.4 Vergleich der Reaktionen von PHA-O-Lymphozyten und B-Zellen

Bei den Ergebnissen in Tab. 14 zeigen sich haeufig Seren, die mit frischen T-Zellen negativ, aber mit PHA-O-Lymphozyten, also ohne Mitogen kultivierten Zellen, positiv reagieren.

Moegliche Erklaerungen fuer diese Reaktionen sind entweder eine erhoehte Labilitaet der kultivierten Zellen oder eine spontane Stimulation der Lymphozyten, auch ohne Mitogen, die zu einer Antigenexpression fuehrt. Weitere Moeglichkeiten sind allein oder in Kombination mit den obengenannten vorstellbar. Zum einen koennten Antigene auch ohne Stimulation exprimiert werden, z.B. durch Demaskierung von Antigenen. Zum anderen koennte waehrend der Kultur eine Subpopulation, etwa B-Zellen oder im menschlichen Blut aktivierte Lymphozyten, expandieren, waehrend der prozentuale Anteil der uebrigen Zellen durch Absterben verringert wuerde.

Liegt eine spontane Stimulation zugrunde, so wuerden die PHA-O-Lymphozyten auch DR-Antigene exprimieren, wie es fuer stimulierte Lymphozyten beschrieben ist (z.B. DeWolf et al 1979).
Dann wuerden Reaktionen der PHA-O-Lymphozyten mit Reaktionen von B-Zellen beim selben Serum korrelieren.
Andernfalls, wenn nur eine unspezifisch verminderte Stabilitaet der PHA-O-Lymphozyten zugrundeliegt, waeren deren positive Reaktionen eher zufaellig verteilt.

Zur Beantwortung dieser Frage lassen sich die entsprechenden Haeufigkeiten in Tab. 14 zu einer Vierfeldertafel zusammenstellen (Tab. 16).

TAB. 16
Vergleich der Reaktionen von B-Zellen und PHA-O-Lymphozyten
(Haeufigkeit des Auftretens von Reaktionsgruppen mit bestimmter Reaktionskombination)

Haeufigkeitstabelle:

Reaktion der B-Zellen	+	+	-	-
Reaktion der PHA-O-Lymphozyten	+	-	+	-
Dazu zaehlen aus Tab. 14 die Werte der Spalten:	13	9	5	1
	14	10	6	2
	15	11	7	3
	16	12	8	4
Summe der Haeufigkeiten:	8	72	12	576

Vierfeldertafel:

		Reaktion der B-Zellen +	Reaktion der B-Zellen -	
Reaktion der PHA-O-Blasten	+	8	12	20
	-	72	576	648
Summe		80	588	668

chi**2 (mit Yates-Korrektur) = 12,7
p < 0,0005

Es zeigt sich, dass von 80 B-Zell-positiven Reaktionsgruppen 8, also 10 %, auch positiv mit PHA-O-Lymphozyten reagieren. Bei den 588 B-Zell-negativen Reaktionsgruppen reagieren 12, also 2 %, auch positiv mit PHA-O-Lymphozyten. Diese Haeufung bei den B-Zell-positiven Reaktionsgruppen ist mit einem chi**2-Wert von 12,7 ($p < 0,0005$) signifikant. Sie spricht fuer eine spontane Stimulation der Lymphozyten oder fuer eine Expansion einer DR-Antigen-tragenden Subpopulation bei einem Teil der PHA-O-Kulturen. Die Haeufung wird noch deutlicher unter Beruecksichtigung der Tatsache, dass auch bei stimulierten Lymphozyten mit PHA-Konzentrationen von 2 und 4 ug/ml, eine Expression von B-Zell-Antigenen nur in etwa einem Drittel der Kulturen nachweisbar ist. (siehe unten, Abschnitt 3.3.5).

3.3.5 DR-Expression auf stimulierten Lymphozyten

Stimulierte Lymphozyten koennen DR-Antigene exprimieren, die im ruhenden Zustand nur auf B-Zellen nachgewiesen werden (siehe 1.3).
Aus Tab. 14 laesst sich die Haeufigkeit der Seren ablesen, die sowohl mit B-Zellen als auch mit mindestens einem der beiden Blastentypen positiv reagieren. Die Haeufigkeiten sind in Tab. 17 dargestellt.

TAB. 17
Vergleich der Reaktionen von B-Zellen und PHA-2- und PHA-4-Blasten
(Haeufigkeit des Auftretens von Reaktionsgruppen mit bestimmter Reaktionskombination)
*) Als blastenpositiv zaehlt hier eine Reaktionsgruppe, die bei mindestens einem der beiden Blastentypen positiv (LZT⩾2) reagiert

Haeufigkeitstabelle:

Reaktion der B-Zellen	+	+	−	−
Reaktion der PHA-Blasten *)	+	−	+	−
Dazu zaehlen aus Tab. 14 die Werte der Spalten:	10 11 12 14 15 16	9 13	2 3 4 6 7 8	1 5
Summe der Haeufigkeiten:	26	54	50	538

Vierfeldertafel:

		Reaktion der B-Zellen +	Reaktion der B-Zellen −	
Reaktion der PHA-Blasten	+	26	50	76
	−	54	538	592
Summe		80	588	668

chi**2 (mit Yates-Korrektur) = 37,8
p < 0,0001

Aus der Vierfeldertafel ergibt sich eine signifikante Korrelation (chi**2=37,8; p<0,0001) zwischen positiver B-Zell- und positiver Blastenreaktion. Dies bestaetigt die, bei anderen Autoren beobachtete, DR-Expression auf aktivierten Lymphozyten.

Im Hinblick auf die Haeufigkeit der DR-Expression zeigt sich, dass von insgesamt 80 B-Zell-positiven Reaktionsgruppen 26 auch bei mindestens einem der beiden Blastentypen positiv reagieren. Dies entspricht einer Rate von 39 % mit der im hier verwendetem Kultur- und Testsystem B-Zell-Antigene auf stimulierten Zellen nachgewiesen werden koennen. Aus den Untersuchungen von DeWolf (DeWolf et al 1979) ergibt sich bei einer PHA-Konzentration von 3 ug/ml nach 6 Tagen Kulturdauer eine entspechende Rate von 38 % .

Tab. 17 zeigt weiterhin 50 Reaktionsgruppen, die mit Blasten positiv, aber mit B-Zellen negativ reagieren. Die Seren, die solche Reaktionsgruppen zeigen, sind Thema der naechsten Abschnitte der Diskussion.

3.3.6 Haeufigkeit blastenpositiver, B-Zell-negativer Reaktionen

Die Zahl der 50 blastenpositiven, B-Zell-negativen Reaktionen in Tab. 17 wird hier eingeschraenkt durch eine schaerfere Definition dieser beiden Kriterien. Wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, gilt als blastenspezifische Reaktionsgruppe nur die, die bei T- und B-Zellen sicher negativ (LZT=0) und bei PHA-2- bzw. PHA-4-Blasten positiv (LZT zusammen $\geqslant$ 3) ist.

Unter diesem Kriterium finden sich bei den absorbierten Seren der Testplatten E6 und CB62 insgesamt 22 blastenspezifische Reaktionsgruppen (siehe Tab. 11 und Tab. 12). Bei insgesamt 672 getesteten Reaktiongruppen mit DR-positiven, absorbierten Seren entspricht dies einer Haeufigkeit von 3 %.

3.3.7 Beschreibung einzelner Seren

In Tab. 18 sind die Seren zusammengefasst, die blastenspezifische Reaktionsgruppen zeigen (Daten aus Tab. 11).
Zusaetzlich sind Informationen ueber deren allgemeine Zytotoxizitaet und DR-Spezifitaet eingetragen. Sie wurden in einer Testreihe mit einem grossen Panel von Zellen bekannter Typisierung gewonnen.

Fuer die Beurteilung einer blastenspezifischen Reaktionsgruppe ist die DR-Spezifitaet des entsprechenden Serums von Bedeutung. Stimmt die DR-Spezifitaet des Serums mit der der Spenderzellen ueberein, so ist die blastenspezifische Reaktion am ehesten durch ein falsch negatives Ergebnis bei der B-Zell-Reaktion und das erwartete positive Ergebnis durch Expression von DR-Antigenen auf den aktivierten Lymphozyten zu erklaeren. Blastenspezifische Reaktionsgruppen mit uebereinstimmender Spezifitaet von Serum und Zelle sind in Tab. 12 durch Klammern gekennzeichnet.

Stimmt die DR-Spezifitaet der Spenderzellen nicht mit der des Serums ueberein (in Tab. 12 ohne Klammern), so erhoeht dies die Wahrscheinlichkeit, dass der blastenpositiven Reaktion blastenspezifische Antigene zugrundeliegen.

TAB. 18
Beschreibung einzelner Seren mit blastenpositiven Reaktionsgruppen:
Schematische Wiedergabe der Ergebnisse aus Tab. 11; Angabe der DR-Spezifitaet der Seren und Angabe des HLA-Typs der Spender.
Abkuerzungen: BBB = Blastenspezifischer Reaktionsgruppe (Def. siehe 3.3.1)
DDD = Reaktionsgruppe vom DR-Typ
(BBB) = Serum und Spender haben uebereinstimmende DR-Spezifitaet

Serumnummer		N 8	N18	N26	N13	N16	N36	N41	N47	N 7	N38	N 9	N10
DR-Spezifitaet		-	3	5	-	2+6	-	1	-	7(+1)	-	2	2
N (Zahl der getesteten Zellen)		-	68	74	-	89	-	85	-	41	-	71	100
Spezifitaet (richtig positive Tests/ positive Tests)		-	52%	75%	-	61%	-	41%	-	52%	-	92%	76%
Sensitivitaet (richtig positive Tests/ positive Zellen)		-	73%	47%	-	59%	-	78%	-	86%	-	96%	76%
Spender: HLA-Genotyp:													
H.L. (Va)	A3, B18, DR3 (A) A2, B13, DR12 (B)	BBB	(BBB)	BBB	BBB	-	-	-	-	-	-	-	-
M.L. (Mu)	A23, B27, DR1 (C) A2, B51, DR5 (D)	-	-	DDD	-	BBB	-	-	-	-	-	-	-
W.L. (K1)	(A/C)	-	-	DDD	-	BBB	BBB	BBB	BBB	-	-	-	-
C.L. (K2)	(A/D)	-	-	DDD	DDD	-	-	-	-	-	-	-	-
M.L. (K3)	(A/D)	-	-	DDD	DDD	-	-	-	-	BBB	BBB	-	-
R.L. (K4)	(B/C)	-	-	-	BBB	DDD	-	-	-	DDD	-	BBB	BBB
E.A.	A2, Bw45, DR1 A3, Bw35, DR7	-	-	-	BBB	-	-	-	-	DDD	-	-	-
G.K.	A3, B18, DR1 A25, B47, DR4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R.F.	A1, B35, DR1 A2, B56, DR6	-	-	-	DDD	-	-	-	-	-	-	BBB	BBB
I.T.	A1, B13, DR7 A24, Bw57, DR4	-	-	-	-	-	-	-	-	DDD	-	DDD	DDD
Haeufigkeit blastenspezifischer Reaktionsgruppen bei 10 Spendern:		10%	10%	10%	30%	20%	10%	10%	10%	10%	10%	20%	20%
Segregation bei Familie L. mit Haplotyp:		-	-	-	B	C?	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 18 zeigt die Verteilung der Reaktionsgruppen auf die einzelnen Seren und Spender. 8 Seren reagieren einmal, 3 Seren reagieren zweimal und 1 Serum reagiert dreimal blastenspezifisch. Auserdem faellt auf, dass die Seren, die blastenspezifische Reaktionsgruppen zeigen, bei Zellen anderer Spender gehaeuf gleichzeitig Blasten- und B-Zell-positiv, also im Sinne einer DR-Spezifitaet reagieren.

3.3.8 Blastenspezifische Reaktionsgruppen innerhalb einer Familie

Testplatte E6 wurde mit 6 Mitgliedern der Familie L. getestet. Haplotyp-verteilung und Reaktionsmuster sind in Tab. 18 wiedergegeben.

10 der Seren zeigen nur mit einem Mitglied der Familie eine blastenspezifische Reaktionsgruppe. Hier koennen Aussagen ueber ein eventuell zugrundeliegendes Vererbungsmuster nicht gemacht werden. Eine blastenpositive Reaktionsgruppe bei nur einem Familienmitglied spricht gegen einen dominanten Vererbungstyp. Grundsaetzlich bieten sich fuer solche Einzelreaktionen innerhalb einer Familie verschiedene Erklaerungsmoeglichkeiten an.

Zum einen koennen sie auf Antigenen beruhen, die nicht vererbt, sondern erworben sind und von momentanen immunologischen oder metabolischen Faktoren abhaengen (z.B. bei viralem Infekt oder bei Medikamenten-einnahme). Zum anderen, auch wenn die entsprechenden Antigene dominant vererbt wuerden, koennte eine unvollstaendige Penetranz vorliegen: entweder auf biologischer Ebene, indem nur bei einem Teil der Gentraeger das blastenspezifische Antigen exprimiert wird; oder auf methodischer Ebene, indem das PHA-System, gebunden an kinetische und konzentrationsabhaengige Faktoren, blastenspezifische Antigene nicht regelmaessig nachweisen laesst.

2 Seren (N 13 und N 16) zeigen blastenspezifische Reaktionsgruppen bei jeweils einem Elternteil und einem Kind der Familie L..

Die blastenspezifischen Reaktionsgruppen des Serums N 13 segregieren in der Familie mit dem Haplotyp B (A2, B13, DRw12). Vater und Kind 4, die den Haplotyp B tragen, reagieren blastenspezifisch mit dem Serum. Mutter und Kinder 1,2 und 3, die den Haplotyp nicht tragen, reagieren nicht blasten-spezifisch mit dem Serum. Gleichzeitig ist im Serum N 13 eine blasten-positive Aktivitaet vom Typ der DR-Expression enthalten, die bei Mutter, Kind 2 und Kind 3, also mit Haplotyp D (A2, B51, DR5) blastenpositiv reagiert.

Die blastenpositiven Reaktionsgruppen des Serums N 16 zeigen eine fragliche Segregation mit Haplotyp C (A23, B27, DR1). Mutter und Kind 1, die den Haplotyp tragen, zeigen entsprechende blastenpositive Reaktions-gruppen. Fuer Kind 4, das auch den Haplotyp C traegt, ist keine blasten-spezifische Reaktion angegeben, weil hier sowohl die Blasten als auch die B-Zellen positiv reagieren. Hier koennte allerdings eine Ueberlagerung von blastenspezifischer und blastenpositiver, B-Zell-positiver Reaktions-gruppe vom Typ der DR-Expression vorliegen. Diese wuerde mit dem anderen Haplotyp von Kind 4, Haplotyp B, segregieren, was mit den Daten fuer die Reaktionen von Serum N 16 kompatibel ist (siehe Tab. 11).

4. DISKUSSION

4.1 Kulturbedingungen

Zur Etablierung von Kulturbedingungen wurde die Abhaengigkeit der drei Messgroessen *T-Inkorporation, Blastenanteil und Viabilitaet von den Kulturparametern Mitogenkonzentration und Stimulationsdauer untersucht.

Aufgrund der Ergebnisse, zusammengefasst in Abchnitt 3.1.5, wurden die PHA-Konzentrationen 0, 2 und 4 ug/ml bei einer Kulturdauer von 5 Tagen gewaehlt. Dies stimmt mit den von Gazit (Gazit et al 1980b) angegebenen Kulturbedingungen ueberein, der bei einer PHA-Konzentration von 3 ug/ml kultivierte Zellen ebenfalls am fuenften Tag untersuchte.

In Tab. 6 der Ergebnisse sind die Daten zum Kulturablauf der einzelnen Zellkulturen wiedergegeben. Die Zahlen machen eine grosse Schwankungsbreite der Kulturergebnisse deutlich. Dies betrifft vor allem die Viabilitaet der Zellsuspensionen, die fuer den LZT-Test von Bedeutung ist.

Zwei Kulturen (Spender R.F. und I.T.) zeigten am Abschluss der Zellkultur 100 % tote Zellen. Dies ist wahrscheinlich auf Kontamination mit Mikroorganismen oder auf Verunreinigung mit einer toxischen Substanz zurueckzufuehren. Abgesehen von diesen beiden Kulturansaetzen fuehrten alle Kulturen zu Zellsuspensionen ausreichender Viabilitaet, die eine aussagekraeftige Untersuchung im LZT-Test erlaubte.

4.2 Reaktion von stimulierten T-Lymphozyten mit unausgewaehlten Schwangerenseren

Thema der Arbeit war die Suche nach Seren mit T-Blasten-spezifischen Antikoerpern. In diesem ersten Teil der Experimente wurden unausgewaehlte Schwangerenseren untersucht.

Der Ablauf der Untersuchungen, deren Ergebnisse im folgenden diskutiert werden, ist in Abb. 5 zusammengefasst.

ABB. 5
Untersuchungsgang und Ergebnisse fuer die Gruppe der unausgewaehlten Schwangerenseren

---

298 unausgewaehlte Schwangerenseren mit
4 Zellspendern (PHA- 0,2 und 4 -Lymphozyten)

===> 34 blastenpositive Reaktionsgruppen
verteilt auf 32 Seren

32 Seren mit mindestens einer blastenpositiver Reaktionsgruppe mit
6 Zellspendern (T-Zellen, B-Zellen, PHA- 0, 2 und 4 -Lymphozyten)

===> 19 blastenpositive Reaktionsgruppen, davon:

9 B-Zell-positiv, blastenpositiv also
Reaktionsgruppen vom DR-Typ;

10 B-Zell-negativ, blastenpositiv also
blastenspezifische Reaktionsgruppen.

32 Seren mit mindestens 1 blastenpositiven Reaktionsgruppe
n a c h Absorbtion mit Thrombozyten, mit
6 Zellspendern (T-Zellen, B-Zelle, PHA- 0, 2 und 4 -Lymphozyten)

===> 1 B-Zell-negative, blastenpositive Reaktionsgruppe
bei einem Serum.

In vier Experimenten mit je einem Spender wurden 298 unausgewaehlte Schwangerenseren untersucht. Bei einem Spender wurden jeweils Lymphozyten, die bei 0, 2 und 4 ug PHA / ml kultiviert waren, untersucht.

Es fanden sich 32 Seren, die mindestens bei einem der vier Spender blastenpositiv reagierten, d.h. negativ mit PHA-0-Lymphozyten und positiv mit PHA-2- oder PHA-4-Lymphozyten.

Grundsaetzlich bieten sich fuer solche blastenpositiven Reaktionen eines Serums 3 Erklaerungen an:

a) Die stimulierten Lymphozyten exprimieren DR-Antigene, gegen die das Serum Antikoerper enthaelt. Diese Moeglichkeit wird durch gleichzeitige Reaktion des Serums mit B-Zellen desselben Spenders untersucht.

b) Die stimulierten Lymphozyten exprimieren verstaerkt HLA-Antigene vom Typ HLA-A, B und C. Schwache zytotoxische Aktivitaet im Serum wird dadurch erst bei den aktivierten Lymphozyten und nicht bei den frischen T-Zellen sichtbar. Zur Kontrolle dieser Moeglichkeit wird das Serum mit Thrombozyten absorbiert, wodurch die Aktivitaet gegen HLA-A,B,C-Antigene dem Serum weitgehend entzogen wird.
c) Die stimulierten T-Lymphozyten exprimieren neue Antigene, die weder auf ruhenden T-Lymphozyten, noch auf ruhenden B-Lymphozyten nachweisbar sind.

Die Voruntersuchung der Seren diente dem Auffinden solcher blastenpositiver Reaktionsgruppen vom Typ a), b) oder c). Durch Kontrolle der Reaktivitaet mit frischen T- und B-Zellen und durch Absorbtion der Seren mit Thrombozyten wurde dann versucht, die blastenpositiven Reaktionen den verschiedenen Erklaerungsmoeglichkeiten zuzuordnen.

Bei weiterer Untersuchung der 32 urspruenglich gefundenen Seren mit Zellen von 6 Spendern fanden sich 19 blastenpositive Reaktionsgruppen (Tab. 9). Durch gleichzeitige Untersuchung von T-Zellen, B-Zellen, PHA-0- , PHA-2- und PHA-4-Lymphozyten bei jedem Spender konnten in dieser Testreihe die blastenpositiven Reaktionsgruppen naeher charakterisiert werden.

Von den 19 blastenpositiven Reaktionsgruppen reagierten 9 auch mit B-Zellen positiv. Bei B-Zellen wurde auch schon eine schwache Reaktion (LZT=1) als positiv bewertet, um sicherzugehen, dass nur bei eindeutig negativer Reaktion (LZT=0) eine DR-Aktivitaet des Serums ausgeschlossen wird. Bei den 9 genannten Reaktionsgruppen kann die Reaktivitaet der aktivierten Lymphozyten durch Expression von DR-Antigenen erklaert werden. Bei Untersuchung derselben Seren nach Absorbtion reagierte keines der Seren mehr B-Zell- und blastenpositiv. Dies kann zwei Ursachen haben: Zum einen kann die Verduennung, die das Serum in Rahmen der Absorbtion erfaehrt, genuegen, um die Konzentration an enthaltenen Antikoerpern vom zytotoxischen in den subtoxischen Bereich zu verschieben. Zum anderen kann das Serum Antikoerper enthalten, die gegen gemeinsame Determinanten von HLA-DR- und HLA-ABC-Antigenen gerichtet sind. Diese wuerden dann ebenfalls von Thrombozyten absorbiert.

Die uebrigen 10 der 19 blastenpositiven Reaktionsgruppen auf Testplatte E3 reagieren mit B-Zellen negativ. Seren mit solchen Reaktionsgruppen koennten Antikoerper gegen blastenspezifische Antigene enthalten. Da diese Reaktionen durch Absorbtion der Seren mit Thrombozyten eliminiert werden, laesst sich jedoch nicht ausschliessen, dass sie auf der verstaerkten Expression von HLA-A,B,C-Antigenen beruhen.

Ein Serum (Serumnr. M1) zeigte im absorbierten Zustand bei Zellen von einem Spender blastenpositive, B-Zell-negative Reaktionen, die vor der Absorbtion des Serums nicht auftraten. Hier ist eine Erklaerung durch verstaerkte HLA-A,B,C-Expression nicht moeglich. Wenn es sich nicht um falsch positive Reaktionen handelt, so ist dieses Serum am ehesten ein Hinweis auf blastenspezifische Antigene.

Die beiden Hauptergebnisse dieses ersten Teils der Untersuchungen waren also:
a) Bei unausgewaehlten Schwangerenseren lassen sich blastenpositive Reaktionsgruppen mit einer Haeufigkeit von 3 % nachweisen.
b) Bei Kontrolle durch Absorbtion der Seren und durch gleichzeitige Untersuchung von B-Zellen lassen sich bis auf eine Ausnahme alle blastenpositiven Reaktionsgruppen durch andere, als durch T-Blastenspezifische Antigene erklaeren.

Insgesamt fand sich in der Gruppe von 298 unausgewaehlten Schwangerenseren nur ein Serum, welches blastenspezifisch reagierte. Falls spezifische Antigene auf stimulierten T-Zellen existieren, dann liegt deren Auspraegung bzw. deren Nachweisbarkeit unter einer Schwelle, die den sicheren Nachweis im vorgegebenen Rahmen der Untersuchung erlauben wuerde. Als vorgegebener Rahmen gilt hier sowohl die Methode, LZT-Test mit allogenen Antiseren, als auch der Umfang der Untersuchungen, d.h. fuer den ersten Teil der Arbeit 298 unausgewaehlte Schwangerenseren bei vollstaendig untersuchten Zellen von 6 Spendern.

Wenn ein T-Blasten-spezifisches Antigen existiert, so liegt seine Auspraegung in einem Bereich unterhalb der "Sensitivitaet" der vorgegebenen Untersuchungsbedingungen. Moegliche Gruende dafuer sind:

a) Die Antigene auf den Zellen treten so selten auf, dass sie bei Untersuchung einer kleinen Gruppe von Spendern nicht erfasst werden.

b) Die entsprechenden Antikoerper sind in der Gruppe von unausgewaehlten Schwangerenseren nicht oder in so niedriger Frequenz enthalten, dass sie bei 298 untersuchten Seren nicht erfasst werden.

c) Die Antigen-Antikoerper-Reaktion ist schwach oder tritt nur bei einer kleinen Subpopulation der stimulierten T-Lymphozyten auf, so dass sie im LZT-Test nicht erkannt wird.

Im zweiten Teil der Untersuchungen wurde eine andere Serumgruppe, Seren mit DR-Antikoerpern, betrachtet. Hier fanden sich deutlichere Hinweise auf blastenspezifische Serumreaktionen.

4.3 Reaktion von stimulierten T-Lymphozyten bei Schwangerenseren mit DR-Antikoerpern

Thema der Arbeit war auch fuer diese Gruppe von Seren die Suche nach T-Blasten-spezifischen Reaktionsgruppen.

Fuer die absorbierten Seren der Testplatten E6 und CB62 finden sich 22 blastenspezifische Reaktionsgruppen. Dies entspricht einer Haeufigkeit von 3 % . PHA-0- und PHA-2-Lymphozyten zeigen zum Teil unterschiedliche, statistisch aber korrelierende Reaktionen mit den Seren. Die aktivierten Lymphozyten zeigen Expression von DR-Antigenen mit eine Haeufigkeit von 30 %, was mit den Werten in der Literatur uebereinstimmt. Fuer zwei Seren (N13 und N16) deutet die Verteilung der blastenspezifischen Reaktionsgruppen innerhalb der untersuchten Familie L. auf eine Segregation mit dem HLA-Haplotyp hin.

Zum Vergleich sollen hier die in der Literatur veroeffenlichten Ergebnisse zu den T-Blasten-spezifischen Antigenen zusammengefasst werden (Tab. 19).

TAB. 19
Zusammenstellung der Ergebnisse in der Literatur zu blastenspezifischen Antigenen: Verwendetes Serummaterial, Haeufigkeiten blastenspezifischer Reaktionsgruppen und Beziehung zum HLA-locus.
Abkuerzungen: MLC = Mixed Lymphozyte Culture; NIH = Standardmethode des National Institute of Health - der in 2.9 beschriebene Lymphozytotoxizitaetstest; NU = nicht untersucht; "-" = keine Angabe.

Autor Jahr Arbeitsgruppe	Gazit et al 1980b Yunis	Christiansen 1981 Dupont	Gerbase de Lima 1981 Degos	Eigene Untersuchung
Lymphozyten-stimulation	PHA Concavalin A	PHA	MLC	PHA
Testmethode	Immun-fluoreszenz	NIH	NIH	NIH
Untersuchte Serumgruppe	HLA-positive Seren	HLA-negative, HLA-A,B,C-pos'e, HLA-DR-positive	HLA-DR-positive	HLA-DR-positive
Zahl der untersuchten Seren	200	203	39	54
Zahl der untersuchten Zellspender	11(39)	38	6	10
Reaktions-gruppen	-	-	234	540
Zahl der blastenspez. Reaktions-gruppen (n;%)	-	-	12; 5%	17; 3%
Zahl der Seren mit blastenspez. Reaktions-gruppen (n;%)	- (2 Seren mit haeufigen blastenspez. Reaktions-gruppen)	42; 20%	6; 15%	12; 22%
Segregation mit HLA-Haplotyp	+ fuer 2 Seren	- bei 9 Seren in 1 Familie	NU	+ fuer 1 Serum ? fuer 1 Serum
Assoziation mit HLA-locus	A1, A3	A1, A10	NU	NU

Zur Interpretation der Ergebnisse ist die Frage zu klaeren, welche Antigene fuer blastenspezifische Reaktionen verantwortlich sein koennen.

Absorbtion der Seren mit Thrombozyten schliesst eine Erklaerung durch verstaerkte Expression von HLA-A,B,C-Antigenen weitgehend aus.

Kontrolle der B-Zell-Reaktion untersucht die Moeglichkeit, ob blastenspezifische Reaktionen auf Expression von DR-Antigenen durch aktivierte T-Zellen beruhen. Offenbar zeigen Seren mit blastenspezifischen Reaktionsgruppen bei anderen Spendern gehaeuft Reaktionen mit DR-Antigenen (siehe Tab. 18). Dies legt die Vermutung nahe, dass die blastenspezifischen Reaktionsgruppen vielleicht doch auf Expression von DR-Antigenen bei aktivierten T-Lymphozyten beruhen. Zwar wird zum Ausschluss dieser Moeglichkeit die Kontrolle mit B-Zellen durchgefuehrt, aber gegen die Validitaet dieser Kontrolle liessen sich zwei Argumente anfuehren.

Zum einen koennte die mit B-Zellen angereicherte Suspension einen nicht genuegend hohen Anteil an B-Zellen enthalten, so dass eine DR-Aktivitaet im Serum unerkannt bliebe. Dem widerspricht, dass fuer jeden der auf Platten E6 und CB62 getesteten Spender bei mindestens einem, meist bei mehreren Seren eine Reaktionsgruppe von LZT=0 fuer angereicherte T-Zellen und von LZT=4 fuer angereichert B-Zellen vorliegt (siehe Tab. 11 und Tab. 12). Dies legt nahe, dass die B-Zell-angereicherte Suspension tatsaechlich einen genuegend hohen Anteil an B-Zellen enthaelt.

Als zweites Argument koennte eine verstaerkte DR-Expression durch T-Lmphozyten angefuehrt werden. Wuerden aktivierte T-Lymphozyten DR-Antigene nicht nur gleich stark wie B-Zellen, sondern analog den HLA-A,B,C-Antigenen vermehrt exprimieren, so koennte dadurch eine schwache DR-Aktivitaet sichtbar werden, die bei ruhenden B-Zellen unerkannt bleibt. Dieser Effekt vermehrter Antigenexpression wird fuer den Bereich der HLA-A,B,C-Antigene durch Absorbtion mit Thrombozyten ausgeschlossen. Da Aktivitaet gegen DR-Antigene auch nach solcher Absorbtion erhalten bleiben kann, ist im vorliegenden Versuchsaufbau die Reaktivitaet eines verstaerkt exprimierten DR-Antigenes mit einem schwachen - und daher bei B-Zellen sublytischen - DR-Antikoerper nicht ausgeschlossen.

Dagegen sprechen allerdings Ergebnisse von DeWolf (DeWolf et al 1979), der bei PHA-stimulierten T-Lymphozyten nach 6 Tagen nur eine DR-Expression von maximal 60 % bezogen auf reine B-Lymphozyten findet. Als Testsystem diente dabei die Methode der Chromfreisetzung.

Schliesslich bleibt die Moeglichkeit eines methodischen Fehlers im LZT-Test. Durch falsch positive Reaktionen bei den stimulierten T-Lymphozyten oder durch falsch negative Reaktionen bei den B-Zellen kann eine T-Blasten-spezifische Reaktionsgruppe vorgetaeucht werden.

Hier sei darauf hingewiesen, dass fuer jedes Serum/Zell-Paar jeweils 5 Einzelreaktionen betrachtet wurden: Reaktion der T- und B-Zellen, der PHA-0-, PHA-2- und PHA-4-Lymphozyten. Bei den drei veroeffentlichten Arbeiten ueber T-Zell-spezifische Antigene wurden jeweils nur 3 Einzelreaktionen pro Serum/Zell-Paar untersucht.

Durch Einbeziehen von zwei Werten fuer das Reaktionsergebnis "Stimulierter T-Lymphozyt" wird die Wahrscheinlichkeit eines methodischen Fehlers verringert.

Darueberhinaus wurde fuer die Definition einer blastenspezifischen Reaktionsgruppe ein restriktives Kriterium gewaehlt, indem die B-Zell-Reaktion als sicher negativ (LZT=0) und die T-Blasten-Reaktion als deutlich positiv (LZT fuer PHA-2- und PHA-4-Lymphozyten zusammen $\geqslant 3$) gefordert wurde.

Das Vorkommen blastenspezifischer Reaktionsgruppen bei der hier untersuchten Gruppe von Seren ist also mit einiger Sicherheit nachgewiesen. Allein von diesen blastenspezifischen Reaktionsgruppen auf die Existenz eines T-Blasten-spezifischen Antigensystems beim Menschen zu schliessen waere verfrueht. Dafuer bietet die Verwendung nur eines Stimulationssystems und nur einer Testmethode, wie sie der Natur und dem Umfang der vorliegenden sondierenden Untersuchung entsprechen, einen zu begrenzten Blickwinkel.

Fuer den sicheren Nachweis eines T-Blasten-spezifischen Antigensystems und seine naehere Charakterisierung waeren folgende Arbeiten geeignet:

a) Untersuchung von stimulierten T-Lymhozyten in weiteren Familien, weil hier gleichzeitig mehrfach kontrollierte blastenspezifische Reaktionswerte und Aussagen ueber deren moeglichen Vererbungstyp gewonnen werden.
b) Verwendung unterschiedlicher Stimulationssysteme (andere Mitogene, Gemischte Leukozytenkultur).
c) Verwendung unterschiedlicher Testmethoden zum Antigennachweis (Chrom-Freisetzung, Immunfluoreszenz, selektive Antikoerperabsorbtion).

Die umfangreichsten Studien in dieser Richtung wurden von den Arbeitsgruppen Gerbase de Lima (Gerbase de Lima et al 1981) und
Gazit (Gazit et al 1980b) veroeffentlicht.
Deren Ergebnisse bieten den bisher staerksten Hinweis fuer die Existenz eines T-Blasten-spezifischen Antigensystems beim Menschen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Thema der Arbeit ist die Antigenexpression auf aktivierten T-Lymphozyten beim Menschen. Dabei steht im Mittelpunkt die Frage nach der Existenz blasten-spezifischer Antigene, die nur auf aktivierten T-Lymphozyten, nicht aber auf ruhenden B- und T-lymphozyten nachgewiesen werden koennen.

Der Arbeit liegen die Veroeffentlichungen einer franzoesischen und zwei amerikanischer Arbeitsgruppen zugrunde (Gerbase de Lima et al 1981, Gazit et al 1980b, Christiansen et al 1981) in denen erstmals die Existenz eines solchen Antigensystems postuliert wurde.

Bei der Maus ist ein entsprechendes T-Zell-spezifisches Antigensystem bekannt. Die Identifizierung analoger Antigene beim Menschen waere fuer die Unterteilung der T-Zellen in funktionelle Subpopulationen und fuer das Verstaendnis der Differenzierung aktivierter Lymphozyten von Bedeutung.

Als Testsystem dient in dieser Untersuchung die in vitro Stimulation peripherer Blutlymphozyten mit Phytohaemagglutinin (PHA).
Die so gewonnenen aktivierten T-Lymphozyten, genannt Blasten, werden im Mikrolymphozytotoxizitaetstest nach Terasaki mit Schwangerenseren zur Reaktion gebracht. Dabei wurde nach Seren gesucht, die positiv mit T-Blasten, aber negativ mit den unstimulierten T-Zellen desselben Spenders reagierten.

Die experimentellen Ergebnisse gliedern sich in drei Teile:
- Etablierung eines Kultursystems
- Untersuchung unausgewaehlter Schwangerenseren
- Untersuchung von Schwangerenseren mit Antikoerpern gegen DR-Antigene

a) Etablierung eines Kultursystems

Eingangs waren fuer die Zellkultur die Parameter PHA-Konzentration und Kulturdauer festzulegen. Dazu diente die Messung der Inkorporation von radioaktiv markiertem Thymidin in die stimulierten Zellen, die Bestimmung des Blastenanteils nach morphologischen Kriterien und die Bestimmung des Anteil lebender Zellen, durch Anfaerben der toten Zellen mit dem Farbstoff Eosin. Angestrebt wurden Kulturbedingungen, die zu einem moeglichst hohem Blastenanteil, bei moeglichst niederem Anteil toter Zellen fuehrten.

Als optimale Parameter wurden eine Kulturdauer von 5 Tagen bei PHA-Konzentrationen von 0, 2 und 4 ug/ml gefunden. Dies entspricht den in der Literatur angegebenen Methoden.

Mit den so festgelegten, konstanten Kulturbedingungen wurden alle Zellkulturen durchgefuehrt. Es ergab sich ein morphologischer Blastenanteil von durchschnittlich 25 % bei einem Anteil toter Zellen von durchschnittlich 21 % fuer PHA 2 ug/ml und 31 % fuer PHA 4 ug/ml.

b) Untersuchung von unausgewaehlten Schwangerenseren

298 unausgewaehlte Schwangerenseren wurden mit den stimulierten und nicht-stimulierten T-Lymphozyten von insgesamt 4 Spendern untersucht.
Es fanden sich blastenpositive Reaktionsgruppen mit einer Haeufigkeit von 3 %.

Aktivierte T-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberflaeche HLA-DR-Antigene, die sonst fast ausschliesslich auf B-Lymphozyten gefunden werden. Um die Natur blastenpositiver Reaktionen naeher zu charakterisieren, muss parallel zur Serumreaktion mit den stimulierten und nicht-stimulierten T-Lymphozyten auch die Serumreaktion mit B-Lymphozyten untersucht werden.

Ausserdem ist bekannt, dass T-Lymphozyten unter Stimulation ihre HLA-Antigene vom Typ A, B und C verstaerkt exprimieren. Seren, die zum Nachweis blastenspezifischer Antigene verwendet werden, muessen daher von Antikoerpern gegen die bekannten Antigene vom Typ A, B und C befreit werden. Dies ist durch Absorbtion der Seren mit Thrombozyten moeglich, deren Oberflaeche reich an HLA-A,B,C-Antigenen ist.

Bei der weiteren Untersuchung wurden diese beiden Kontrollkriterien miteinbezogen. Das heisst, die Seren wurden vorher mit Thrombozyten absorbiert und pro Spender wurden insgesamt 5 verschiedene Zellsuspensionen zur Reaktion gebracht: frische T-Lymphozyten, frische B-Lymphozyten, sowie bei 0, 2 und 4 ug PHA / ml stimulierte Lymphozyten. Die Ergebnisse dieser 5 Einzelreaktionen pro Serum/Zell-Paar werden zusammenfassend als Reaktionsgruppe bezeichnet.

Bei der Untersuchung der oben gefundenen blastenpositiven Seren mit Zellen von 6 weiteren
Spendern, diesmal mit Kontrolle durch Absorbtion des Serums und gleichzeitige Untersuchung der B-Zellen, zeigte sich, dass bis auf eine Ausnahme alle blastenpositiven Reaktionsgruppen entweder nach Absorbtion des Serums verschwinden oder durch Expression von DR-Antigenen erklaerbar sind.

In dieser Gruppe von Seren fand sich somit kein deutlicher Hinweis auf die Existenz T-Blasten-spezifischer Reaktionen.

c) Untersuchung von Schwangerenseren mit DR-Antikoerpern

54 absorbierte Seren mit DR-Aktivitaet wurden mit Zellen von 10 Spendern, 48 weitere solche Seren mit Zellen von 6 Spendern untersucht. Jedes Serum wurde pro Spender wieder mit fuenf verschiedenen Zellsuspensionen zur Reaktion gebracht: frische T- und B-Zellen, sowie bei 0, 2 und 4 ug PHA / ml stimulierte Lymphozyten.

Es finden sich folgende Ergebnisse:

- Ohne Mitogen kultivierte T-Lymphozyten (PHA 0 ug/ml) zeigen in 3 % der Faelle eine positive Serumreaktion, obwohl dasselbe Serum bei den frischen T-Lymphozyten desselben Spenders negativ reagiert. Diese Reaktionen korrelieren mit positiven B-Zell-Reaktionen, sind also am ehesten durch eine schwache Spontan-stimulation mit DR-Expression zu erklaeren.

- Bei den mit PHA stimulierten
  Lymphozyten finden sich gehaeuft positve Reaktionen mit den Seren. Die positiven Reaktionen sind fuer PHA-2- und PHA-4-Lymphozyten nicht immer einheitlich, zeigen statistisch aber eine hohe Korrelation.

- Die aktivierten Lymphozyten zeigen Expression von DR-Antigenen mit einer Haeufigkeit von 30 %, was mit den Werten in der Literatur uebereinstimmt.

- Es finden sich 22 blastenspezifische Reaktionsgruppen, d.h. Serum-Zell-Paare, bei denen die T- und B-Zellen negativ und die aktivierten T-Lymphozyten positiv mit dem Serum reagieren. Dies entspricht einer Haeufigkeit von 3 %. Die Verteilung der blastenspezifischen Reaktionsgruppen zeigt einen isospezifischen Charakter, d.h. verschiedene Seren reagieren bei unterschiedlichen Zellspendern blastenspezifisch. Fuer zwei Seren (N13 und N16) deutet die Verteilung innerhalb einer untersuchten Familie auf eine Segregation mit dem HLA-Haplotyp hin.

Das Vorkommen blastenspezifischer Reaktionsgruppen bei der hier untersuchten Serumgruppe ist mit einiger Sicherheit nachgewiesen. Dies macht die Existenz T-Blasten-spezifischer Antigene wahrscheinlich, genuegt allein aber noch nicht fuer einen endgueltigen Nachweis.

Dazu sind ergaenzende Untersuchungen bei weiteren Spenderfamilien, sowie die Kontrolle der Ergebnisse in anderen Kultur- und Testsystemen notwendig. Die Seren mit blastenspezifischen Reaktionsgruppen, die mit Hilfe der vorliegenden Arbeit gefunden wurden, sollen in dieser Richtung naeher untersucht werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

ALBERT, E. D., GOETZE, D.: The major histocompatibility system in man. In: Goetze (ed.) The Major Histocompatibility System in Man and Animals. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New york, pp. 7-78 (1977)

ALBERT, E. D., SCHOLZ, S.: Das Haupthistokompatibilitaetssystem (HLA) des Menschen: Serologie, Genetik und klinische Bedeutung. Immunforschung in Klinik und Labor, Freseniusstiftung, pp. 77-105 (1979)

BACH, F. H., ALBERTINI, R. J., KLOSTERMANN, H., DAY, E.: Evaluation of compatibility at the major histocompatibility locus in man. Histocompatibility Testing, pp. 55-65, Munksgaard, Copenhagen (1967)

BENDER, K.: Das HLA-System. Biotest-Serum Institut, Frankfurt (1978)

BOYUM, A.: Separation of Leukocytes from Blood and Bone Marrow. Scand. J. clin. Lab. Invest., Vol. 21 Suppl. 97, pp. 77-89 (1968)

CHRISTIANSEN, F. T., KIM, S. J., GOSAR, I., SILVER, D. M., POLLACK, M. S., DUPONT, B.: Alloantibodies reacting exclusively with PHA-activated T-lymphocytes. Transplantation Proceedings, Vol. 13, No. 1, pp. 1189-1192 (1981)

DANILOVS, J., TERASAKI, P. I., PARK, M. S., AYOUB, G.: B-Lymphozyte Isolation by Thrombin-Nylon Wool. In: Terasaki, P. (ed.) Histocompatibility Testing 1980. UCLA tissue typing laboratory, Los Angeles (1980)

DAUSSET, J.: Iso-Leuco-anticorps. Acta Haematol., Vol. 20, pp. 156-166, Basel (1958)

DAUSSET, J., COLOMBANI, J., LEGRAND, L., FEINGOLD, N.: Le deuxieme sub-locus du systeme HL-A. Nouv. Rev. Franc. Hematol., Vol. 8, pp. 861 ff, (1968)

DAVIDSON, W. F., PARISH, C. R.: A procedure for removing red cells and dead cells from lymphoid cell suspensions. J. of Immun. Methods, Vol. 7, pp. 291-300 (1975)

DeWOLF, W. C., SCHLOSSMAN, S. F., YUNIS, E. J.: DRw antisera react with activated T-cells. J. Immunol., Vol. 122, pp. 1780-1784 (1979)

GAZIT, E., TERHORST, C., YUNIS, E. J.: The human 'T' genetic region of the HLA linkage group is a polymorphism detected on lectin-activated lymphocytes. Nature, Vol. 284, pp. 275-277 (1980a)

GAZIT, E., TERHORST, C., MAHONEY, R. J., YUNIS, E. J.: Alloantigens of the Human T (HT) Genetic Region of the HLA Linkage group. Human Immunol., Vol. 1, pp. 97-109 (1980)

GERBASE DE LIMA, M., WOLLMAN, E., LEPAGE, V,. DEGOS, L., DAUSSET, J.: Alloantigens expressed on activated human T cells different from HLA-A, B, C, and DR Antigens. Immunogenetics, Vol. 13, pp. 529-537 (1981)

GORER, P. A.: The antigenic basis of tumour translantation. J. Pathol. Bacteriol., Vol. 47, pp. 231-252 (1938)

GREAVES, M. F., VERBI, W., FESTENSTEIN, H., PAPESTERIADES, C., JEROQUIMIDA, D., HAYWARD, A.: "Ia-like" antigens on human T cells. Eur. J. Immunol., Vol. 9, 356-362 (1979)

HAEMMERLING, G. J., HAEMMERLING, U., FLAHERTY, L.: Qat-4 and Qat-5, new murine T-cell antigens governed by the Tla Region and identified by monoclonal antibodies. J. Exp. Med., Vol. 150, pp. 108-116 (1979)

HANDMAKER, S.D., COOPER, H. L., LEVENTHAL, B. G.: The kinetics of PHA-stimulation of human lymphocytes. In: Rieke (ed.) Proceedings of the Third Annual Leucocyte Culture Conference, pp. 13-29, Appleton, New York (1967)

JANOSSY, G., GREAVES, M. F.: Lymphocyte activation: Response of T and B Lymphocytes to Phytomitogens. Clin. exp. Immunol., Vol. 9, pp. 483-498 (1971)

KATZ, D. H., HAMAOKA, T., BENACERRAF, B.: Cell interactions between histoincompatible T and B lymphocytes. II. Failure of physiologic cooperative interactions between T and B lymphocytes from allogeneic donor strains in humoral response to hapten-protein conjugates. J. Exp. Med., Vol. 137, pp. 1405-1418 (1973)

KIM, S. J., CHRISTIANSEN, F. T., GOSAR, I., SILVER, D. M., POLLACK, M. S., DUPONT, B.: Frequency of alloantibodies reacting with PHA-activated T lymphocytes, unexplainable by known HLA activities. Human Immunol., Vol. 4, pp. 347-355 (1980)

KLEIN, J., FLAHERTY, L., VANDEBERG, J. L., SHREFFLER, D. C.: H-2 haplotypes, genes, regions and antigens: First listing. Immunogenetics, Vol. 6, pp. 489-512 (1978)

KO, H., FU, S. M., WINCHESTER, R. J., YU, D. T., KUNKEL, H. G.: Ia determinants on stimulated human T lymphocytes. Occurrence in mitogen and antigen-activated T cells. J. Exp. Med., Vol. 150, pp. 246-255 (1979)

LEVENTHAL, B., OPPENHEIM, J. J.: Effect of cell density on the rate and degree of response of leucocyte and purified lymphocyte cultures. In: Rieke (ed.) Proceedings of the Third Annual Leukocyte Culture Conference, Appleton, New York, pp. 13-29 (1967)

McCUNE, J. M., HUMPHREYS, R. E., YOCUM, R. R., STROMINGER, J. L.: Enhanced representation of HL-A antigens on human lymphocytes after mitogenesis induced by phytohemagglutinin or Epstein-Barr virus. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 72, pp. 3206-3209 (1975)

NOWELL, P. C.: PHA: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res., Vol. 20, pp. 562 ff. (1960)

RASANEN, V., WEBER, T. H., GRASBECK, R.: Cristalline Kidney-Bean Leucoagglutinin. Eur. J. Biochem., Vol. 38, pp. 193-200 (1973)

SANDBERG, L., THORSBY, E., KISSMEYER-NIELSEN, F., LINDHOLM, A.: Evidence of a third sublocus within the HL-A chromosomal region. In: Terasaki (ed.) Histocompatibility Testing 1970, Munksgaard, Copenhagen, pp. 165-170 (1970)

SNELL, G. D.: Methods for the study of histocompatibility genes. J. Genetics, Vol. 49, pp. 87-108 (1948)

SUCIU-FOCA, N., SUSINNO, E., McKIERNON, P., ROHOWSKY, C., WEINER, J., RUBINSTEIN, P.: DRw determinants on human T cells primed against allogeneic lymphocytes. Transplant. Proc., Vol. 10, pp. 845-848 (1978)
TERASAKI, P. I., McCELLAND, J. D.: Micodroplet assay of human serum cytotoxins. Nature, Vol. 206, pp. 998 ff. (1964)

TERASAKI, P. I.: Histocompatibility Testing 1980, UCLA tissue typing laboratory, Los Angeles (1980)

VanROOD, J. J.: Leukocyte Grouping: A method and its application. Thesis, Leyden. Drukkeris Pasmans, Den Haag (1962)

WAITHE, W. I., HIRSCHHORN, K.: Lymphocyte response to activators. In: Weir (ed.) Cellular Immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 26.1-26.10 (1978)

WEBER, T., NORDMAN, C. T., GRASBECK, R.: Separation of Lymphocyte Stimulating and Agglutinating Activities in phytohemagglutinin (PHA) from Phaseolus Vulgaris. Scand. J. Haemat., Vol. 4, pp. 77-80 (1967)

8. LEBENSLAUF

1957	Geboren am 17. Juni als Sohn von Dr. Josef Endres, Internist in Augsburg, und Frau Gabriele Endres
1975	Abitur am neusprachlich-humanistischen Gymnasium bei St. Anna in Augsburg
1975	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen
1978	Physikum
1978	Aufnahme als Stipendiat in die Studienstiftung des deutschen Volkes
1976/77 1978/79	Zwei Studienjahre am College der Harvard Universitaet in Boston/USA: naturwissenschaftliches Fachstudium mit Schwerpunkt Immunologie; Bachelor-of-Arts Diplom in Biochemie (magna cum laude) im Juni 1979
1980	1. Staatsexamen
1982	2. Staatsexamen
April 1982	Beginn des praktischen Jahres:

- Dreimonatiges Praktikum der Inneren Medizin am Beth Israel Hospital der Harvard Universitaet
- Tertial Paediatrie an der von Hauner'schen Kinderklinik
- Tertial Innere Medizin an der Medizinischen Klinik Innenstadt
- Tertial Chirurgie an der Chirurgischen Klinik Nussbaumstrasse

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ekkehard Albert fuer die Ueberlassung des Themas und fuer die freundliche, engagierte Betreuung, mit der er mich bei der Arbeit unterstuetzt hat. Allen Mitarbeitern des Labors Prof. Albert danke ich fuer die grosse Hilfsbereitschaft waehrend der vergangenen drei Jahre, besonders Frau Beate Schiessl und Dr. Menne Scholz fuer die Hilfe bei der Auswahl der Seren, Frau Brigitte Beyer fuer die Anleitung in der Zelltestung und Frau Luiza Petzl fuer die unermuedliche Unterstuetzung bei der Durchfuehrung der Zellkulturen.